

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. med. vet. Thomas Göbel

Angefertigt in der
Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie
der Medizinischen Hochschule Hannover
(Dr. med. Thomas Wirth)

Untersuchungen zur Erreichung
verbesserter CD8⁺-T-Zell-Immunantworten durch
Vakzinierung mit PLGA-Mikrosphären

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen
Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Benjamin Brinkhoff

aus Hannover

München 2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Tag der Promotion: 09. Februar 2013

Meiner Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	12
1	Immunologische Grundlagen.....	13
1.1	Zwei Hauptwege der spezifischen Immunreaktion.....	14
1.1.1	Bedeutung und Wirkweise der CD8 ⁺ -T-Zell-Immunantwort	16
1.1.2	Ablauf von T-Zell-Immunreaktionen	16
1.1.3	Die besondere Bedeutung dendritischer Zellen für die CD8 ⁺ -T-Zell- Immunantwort.....	18
1.1.3.1	Costimulation als Erfordernis für CD8 ⁺ -T-Zell-Aktivierung	18
1.1.3.2	Unterschiedliche Antigene führen zu unterschiedlicher MHC- Präsentation.....	19
1.2	B-Zellen und T-Zellen als Grundlage für Vakzinierungssysteme	20
1.2.1	Vakzinierungen gegen Tumoren.....	21
1.2.2	T-Zell-Vakzinierung mit dendritischen Zellen	22
1.2.3	Unspezifische Immunstimulanzen und ihre Rolle als Adjuvanzen in der Vakzinierung.....	23
1.2.3.1	TLR-Liganden in der Vakzinierung.....	23
1.2.3.2	TLR-3-Liganden und ihre Rolle in der T-Zell-Immunantwort.....	24
2	Einsatz von Mikrosphären aus PLGA in T-Zell- Vakzinierungsstrategien.....	25
2.1	Chemische Grundlagen: Poly(D-, L-(Laktat)-co-Glykolat)	25
2.2	Mikrosphären aus PLGA	25
2.2.1	Definition von PLGA-Mikrosphären	25
2.2.2	Herstellung von PLGA-Mikrosphären.....	26
2.2.2.1	PLGA-MS-Herstellung mittels Lösungsmittelverdunstungstechnik ..	26
2.2.2.2	PLGA-MS-Herstellung mittels Sprühtrocknungstechnik	26
2.2.3	Beladung der PLGA-Mikrosphären mit Molekülen	27
2.2.3.1	Einkapselung von Molekülen in PLGA-Mikrosphären	27
2.2.3.2	Konjugation von Peptidantigen an PLGA-Mikrosphären.....	28
2.2.4	Physiologische Eigenschaften von PLGA-Mikrosphären	28
2.2.5	Verwendung von PLGA-Mikrosphären.....	29
2.3	Besondere Bedeutung von PLGA-Mikrosphären für T-Zell- Vakzinierungsmodelle	29

3	Aspekte für ein innovatives T-Zell-Vakzinierungssystem auf der Basis von PLGA-Mikrosphären	30
3.1	Ansatz- und Untersuchungspunkte für eine neuartige Vakzinierung	30
3.2	Der „Boosting-Effekt“ für die CD8 ⁺ -T-Zell-Vakzinierung	31
3.3	Listeria monocytogenes in der T-Zell-Vakzinierung: Vektor und Gefahrensignal	32
3.3.1	Listerien als Vektoren mit T-Zell-Immunogenität.....	33
3.3.2	Listerien als Gefahrensignal in Kombination mit PLGA	33
3.4	Adjuvantien im Zusammenhang mit PLGA-Vakzinierung	34
4	Zielsetzung für die vorliegende Arbeit.....	35
II	MATERIAL UND METHODEN	37
1	Material.....	37
1.1	Verbrauchsmaterialien	37
1.2	Geräte	38
1.3	Chemikalien und Reagenzien	39
1.3.1	Antikörper	39
1.3.2	Ausstattung mit Lösungen zur Zellfixation und -permeabilisation	39
1.3.3	Lösungen für die Färbung mit intrazellulären Antikörpern	40
1.3.4	Lösungen für die Isolierung dendritischer Zellen	40
1.3.5	Rezepturen	40
1.3.6	Peptide.....	41
1.3.7	Sonstige Chemikalien und Reagenzien.....	42
1.4	Versuchstiere.....	43
1.5	Bakterien	43
1.6	Zelllinien	44
2	Methoden	44
2.1	Biochemische, zellbiologische und mikrobiologische Methoden	44
2.1.1	Konjugation von Peptidantigen an PLGA-Mikrosphären.....	44
2.1.2	Isolierung und Antigenbeladung dendritischer Zellen.....	45
2.1.2.1	Gewinnung von Milzzellysat und Antigenbeladung der Zellen	45
2.1.2.2	Isolierung der dendritischen Zellen und Herstellung des Ansatzes für die Injektion in die Versuchstiere	45
2.1.3	Herstellung von Listeria-Bakteriensuspensionen	46

2.1.4	Herstellung von SIINFEKL-H-2K ^b -Tetramer-APC	47
2.2	Durchführung der Tierversuche	47
2.2.1	Haltung der Tiere	47
2.2.2	Applikationstechniken	48
2.2.3	Probengewinnung	48
2.3	Analytische Methoden	48
2.3.1	Aufbereitung und Färbung von Leukozyten für die durchflußzytometrische Analyse	48
2.3.1.1	Blutproben.....	48
2.3.1.2	Leukozyten aus der Milz.....	50
2.3.1.2.1	Färbung mittels Oberflächenantikörpern	51
2.3.1.2.2	Färbung auf Funktionsmarker mit In-vitro-Stimulation	51
2.3.2	Probenanalyse mittels Fluoreszenzdurchflußzytometrie	52
2.3.3	Auswertung der durchflußzytometrisch gewonnenen Daten	52
2.4	Statistische Auswertung.....	54
III	ERGEBNISSE	55
1	Festlegung eines geeigneten Vakzinierungsschemas mit Kurzzeit- Intervall-Boosting und PLGA-Mikrosphären.....	56
1.1	Stärke der spezifischen CD8 ⁺ -T-Zell-Immunantwort.....	57
1.2	Stärke der gesamten CD8 ⁺ -T-Zell-Immunantwort	58
2	Einfluß der Antigenmenge im Priming auf Stärke und Typ einer sekundären Immunantwort durch Boosting	58
2.1	Stärke der spezifischen CD8 ⁺ -T-Zell-Immunantwort.....	59
2.2	Stärke der gesamten CD8 ⁺ -T-Zell-Immunantwort	60
2.3	Charakterisierung der spezifischen CD8 ⁺ -T-Zell-Population.....	60
3	PLGA-Mikrosphären als Träger primären Antigens im Vergleich zu dendritischen Zellen.....	63
3.1	Stärke der spezifischen CD8 ⁺ -T-Zell-Immunantwort.....	63
3.2	Stärke der gesamten CD8 ⁺ -T-Zell-Immunantwort	64
4	T-Zell-Immunogenität bei unterschiedlich langen Peptidantigenen an PLGA-Mikrosphären im Priming.....	66
4.1	Priming-Antigen: Vergleich von Gesamtprotein, 20mer und 8mer....	66
4.1.1	Stärke der spezifischen CD8 ⁺ -T-Zell-Immunantwort.....	66

4.1.2	Stärke der gesamten CD8 ⁺ -T-Zell-Immunantwort	68
4.2	Priming-Antigen: Gesamtprotein im Vergleich mit MHC-I-Epitop...	68
4.2.1	Stärke der spezifischen CD8 ⁺ -T-Zell-Immunantwort.....	69
4.2.2	Stärke der gesamten CD8 ⁺ -T-Zell-Immunantwort	69
5	Auswirkung der Größe im Priming eingesetzter PLGA-Mikrosphären auf die induzierbare Immunantwort	70
5.1	Vier Sorten PLGA-Mikrosphären unterschiedlichen Durchmessers ..	71
5.1.1	Stärke der spezifischen CD8 ⁺ -T-Zell-Immunantwort.....	71
5.1.2	Stärke der gesamten CD8 ⁺ -T-Zell-Immunantwort	72
5.2	PLGA-Mikrosphären von 2,0 µm und 0,2 µm im Vergleich.....	72
5.2.1	Stärke der spezifischen CD8 ⁺ -T-Zell-Immunantwort.....	73
5.2.2	Stärke der gesamten CD8 ⁺ -T-Zell-Immunantwort	73
6	Durch Boosting induzierbare T-Zell-Antworten nach verschiedenen Injektionsarten für PLGA-Mikrosphären im Priming.....	74
6.1	Stärke der spezifischen CD8 ⁺ -T-Zell-Immunantwort.....	75
6.2	Stärke der gesamten CD8 ⁺ -T-Zell-Immunantwort	75
7	Einfluß von Poly(I:C) auf Priming mit PLGA-Mikrosphären im Vergleich zu Priming mit dendritischen Zellen	77
7.1	Stärke der spezifischen CD8 ⁺ -T-Zell-Immunantwort.....	78
7.2	Stärke der gesamten CD8 ⁺ -T-Zell-Immunantwort	79
7.3	Anteil antigenspezifischer Zellen an CD8 ⁺ -T-Zell-Population	80
7.4	Phänotypische Charakterisierung der T-Zell-Immunantwort	81
8	Ausmaß der T-Zell-Immunogenität des untersuchten Vakzinierungsansatzes in einem Modell mit Autoantigen	82
8.1	Stärke der spezifischen CD8 ⁺ -T-Zell-Immunantwort.....	83
8.2	Stärke der gesamten CD8 ⁺ -T-Zell-Immunantwort	84
8.3	Funktionalität der antigenspezifischen CD8 ⁺ -T-Zellen	84
8.3.1	Bestimmung des Anteils antigenspezifischer und aktivierter Milzleukozyten 70 Tage nach LM-OVA-Injektion	85
8.3.2	Bestimmung der Funktionsmarker IFN-γ, IL-2 und TNF-α in Milzleukozyten	85
IV	DISKUSSION.....	87

1	T-Zell-Boosting-Strategien mit PLGA-Mikrosphären.....	87
1.1	Sequenz und Art der Antigenverabreichung als entscheidender Punkt für ein pathogenbasiertes Kurzzeit-Boosting.....	87
1.2	Die Menge an Priming-Antigen beeinflusst Ausmaß und Charakter der sekundären Immunreaktion.....	89
1.3	PLGA-Mikrosphären im Vergleich zu dendritischen Zellen als primäre Antigenträger vor einem Pathogen-Boosting	90
1.4	Modifikationen des PLGA-Primings zeigen immunologische und technologische Flexibilität des Vakzinierungssystems.....	91
1.4.1	Unterschiedliche Applikationsarten im Priming schaffen ähnliche Voraussetzungen für Kurzzeit-Boosting.....	91
1.4.2	Kurzzeit-Boosting nach PLGA-Priming mit Peptidantigenen unterschiedlicher Dimension möglich	92
1.4.3	Partikuläre Antigengabe mittels PLGA muß Phagozytosekapazität der DC berücksichtigen, ist aber nicht zu eng festgelegt.....	93
2	Zusätzliche Gabe eines TLR-Liganden verstärkte die sekundäre Immunreaktion auch bei Kurzzeit-Boosting	94
3	PLGA-basierte Vakzinierung mit Boosting kann auch bei autologem Antigen CD8⁺-T-Zell-immunogen sein.....	97
4	Medizinische Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick	98
V	ZUSAMMENFASSUNG	101
VI	SUMMARY	102
VII	LITERATURVERZEICHNIS.....	103
VIII	DANKSAGUNG.....	116

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

20mer	Eikosamer
8mer	Oktamer
Ag	Antigen
Alb	Albumin
APC	antigenpräsentierende Zelle(n) (engl. <i>antigen presenting cell(s)</i>)
-APC	-Allophycocyanin
AS	Aminosäure
BSA	bovines Serumalbumin
CD	Differenzierungsgruppe(n) (engl. <i>cluster of differentiation</i>)
CpG-ODN	Cytosin-Phosphat-Guanin-Oligodesoxynukleotid
DC	dendritische Zelle(n) (engl. <i>dendritic cell(s)</i>)
DCM	Dichlormethan
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
ds-RNS	doppelsträngige Ribonukleinsäure
EDAC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)Carbodiimid-Hydrochlorid
FACS	Fluoreszenzdurchflußzytometrie (engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	fötales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLP	Gesamtprotein (engl. <i>full length protein</i>)
FLT3-L	Ligand des Zytokinrezeptors FLT3
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. <i>foreward scatter</i>)
G	Gauge
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-kolonestimulierender Faktor
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-(2-ethansulfonsäure)
HIV	humanes Immunschwächevirus
i. m.	intra muscolum
i. p.	intra peritoneum
i. v.	intra venam
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin

IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KLRG1	Killerzellen-lektinähnlicher Rezeptor G1 (engl. <i>killer cell lectin-like receptor G1</i>)
LM	Listeria monocytogenes
LM-OVA	ovalbuminexprimierende Listeria monocytogenes
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar(e), mol/l
MACS	magnetische Zelltrennung (engl. <i>magnetic cell separation</i>)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
mM	millimolar(e), mmol/l
MS	Mikrosphäre(n)
MW	Mittelwert
n. s.	nicht signifikant
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PAMP	pathogenassoziierte(s) molekulare(s) Muster (engl. <i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PE	Phycoerythrin
PLGA	Poly(D-, L-(Laktat)-co-Glykolat) (engl. <i>poly(d, l-lactic-co-glycolic acid)</i>)
Poly(I:C)	Polyinosin-Polycytidylsäure
PRR	Mustererkennungsrezeptor(en) (engl. <i>pattern recognition receptor(s)</i>)
PS	Penicillin-Streptomycin
PVA	Polyvinylalkohol
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI	Zellkulturmedium in der Formulierung „RPMI-1640“
s. c.	sub cutis
sek.	sekundär
SEM	Standardfehler (engl. <i>standard error of the mean</i>)
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. <i>sideward scatter</i>)
TAP	Antigenpeptidtransporter (engl. <i>transporter associated with antigen processing</i>)

TCM	zentrale T-Gedächtniszelle(n) (engl. <i>central memory T-cell(s)</i>)
TEM	Effektor-T-Gedächtniszelle(n) (engl. <i>effector memory T-cell(s)</i>)
TET	Tetramer
TLR	Toll-ähnliche(r) Rezeptor(en) (engl. <i>Toll-like receptor(s)</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
TSB	Trypton-Soja-Bouillon
U/min	Umdrehungen pro Minute
WBZ	Weißer Blutzellen
WMZ	Weißer Milzzellen
WT	Wildtyp

I EINLEITUNG

Infektionskrankheiten durch intrazelluläre Erreger sowie Tumorerkrankungen sind weitverbreitete Leiden, gegen die in vielen Fällen bislang weder wirksame Vorbeugung noch befriedigende Therapien verfügbar sind.

Während antikörperbasierte Vakzinierungen medizingeschichtlich in der Eindämmung und Ausrottung von Infektionskrankheiten Bedeutendes geleistet haben, ist die Nutzung T-Zell-basierter Vakzinierungssysteme für Vorbeugung wie Behandlung vergleichsweise gering entwickelt und im Menschen noch kaum etabliert. In den vergangenen Jahren wurde diesem Gebiet verstärkte Aufmerksamkeit zuteil.

Nachdem die Applikation löslicher Antigene ohne die Induktion einer systemischen Entzündung sich als nicht geeignet für die Generierung einer wirkungsvollen spezifischen T-Zell-Immunantwort erwiesen hat, wurden, v. a. mit Blick auf mögliche therapeutische Anwendung gegen Tumoren, Vakzinierungen entwickelt, bei denen Antigen vermittelt dendritischer Zellen appliziert wird. Doch auch dieses Prinzip hat erhebliche Nachteile, insbesondere erheblichen medizinisch-technischen Aufwand und sehr hohe Kosten, weswegen T-Zell-Vakzinen noch keine breite Anwendung finden.

Auf PLGA basierende Polymermikrobiopartikel (Mikrosphären) könnten für T-Zell-Vakzinierungsstrategien eine praktikable und kostengünstige Alternative als Trägerstoff für die Antigenapplikation darstellen. Sie zeichnen sich durch vollständige biologische Abbaubarkeit im Organismus aus und sind als Hilfsstoff für die Applikation von Depotarzneimitteln seit einigen Jahren auch im Menschen zugelassen. In Versuchen in vitro und in vivo haben sich PLGA-Mikrosphären als für die Induktion von T-Zell-Immunantworten geeignet erwiesen, wozu es aber zusätzlicher Stimuli in Form unspezifischer Adjuvanzen oder wiederholter Antigenapplikation bedurfte. Folglich gilt es, für PLGA-basierte T-Zell-Vakzinierungen geeignete Applikationsprotokolle zu entwickeln und zu optimieren.

Ein in der Immunologie seit langem bekannter und v. a. auch für antikörperbasierte Vakzinierungen genutzter Vorteil ist der Effekt, daß der Organismus nach einem Erststimulus durch ein Antigen bei erneutem Kontakt mit

diesem Antigen oder in Verbindung mit einem erneuten immunogenen Stimulus mit einer qualitativ veränderten und verstärkten Immunantwort reagiert. Dieser „Boosting-Effekt“ könnte möglicherweise auch die Wirksamkeit PLGA-basierter T-Zell-Vakzinierungen im Sinne verbesserter Immunantworten erhöhen.

Mit dem mittelfristigen Ziel prophylaktischer und therapeutischer Nutzung von T-Zell-Vakzinierungen sind Strategien zur Generierung spezifischer T-Zell-Immunantworten von großer Bedeutung. Diesem Aspekt Rechnung tragend, ist die Nutzung eines Kurzzeit-Intervall-Boostings mit Pathogenen, das in der vorliegenden Arbeit untersucht wird, ein neuartiger Ansatz auf dem Weg zur praxistauglichen Etablierung PLGA-basierter Vakzinierungen.

1 Immunologische Grundlagen

Höhere Lebewesen verfügen zur Abwehr von Gewebeschädigungen durch Krankheitserreger, Tumorzellen und andere Noxen über das Immunsystem. Dieses komplexe System sorgt dafür, daß Pathogene und schädigendes Material entfernt werden und fehlerhaft gewordene Zellen des Körpers unschädlich gemacht, also getötet werden. Moleküle, die durch das Immunsystem erkannt werden können und die daher potentiell eine Immunreaktion auslösen können, bezeichnet man als Antigene.

Zum Immunsystem gehören mechanische und physiologische Barrieren (u. a. Häute und Schleimhäute), Zellen (u. a. Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten, zusammengefaßt als „zelluläre Bestandteile“) sowie Proteine, die unter dem Begriff „humorale Bestandteile“ zusammengefaßt werden (z. B. Antikörper, Interleukine und die Bestandteile des Komplementsystems). Im Gegensatz zu den humoralen Bestandteilen können die Zellen des Immunsystems auf spezifische oder unspezifische Stimulation gezielte Wanderungen in verschiedene Gewebe im Körper durchführen.

Die Mechanismen des Immunsystems umfassen einen angeborenen und einen erworbenen Teil. Die angeborene Immunantwort ist für jeden Organismus lebenslang festgelegt. Ihrem Vorteil, auch bei erstmaligem Antigenkontakt sehr schnell auf einen schädigenden Einfluß reagieren zu können, steht der Nachteil entgegen, daß sie z. B. auf neue oder veränderte Krankheitserreger oder wiederholten Antigenkontakt nicht mit entsprechender Anpassung reagieren kann.

Eine solche Anpassung erfolgt durch das adaptive oder erworbene Immunsystem im Rahmen der spezifischen Abwehr. Angeborenes und erworbenes Immunsystem stehen jedoch nicht unabhängig voneinander, sondern können nur im Zusammenspiel eine wirkungsvolle Abwehr des Körpers gewährleisten.

Gelingt es einem Erreger, die mechanischen Barrieren des Körpers zu überwinden, kommt es zu einer Immunreaktion. Hierbei ist für die spezifische Abwehr grundsätzlich zu unterscheiden, ob es sich für den betroffenen Organismus und sein Immunsystem um den ersten Kontakt mit diesem Erreger handelt oder ob er diesem bereits zuvor ausgesetzt war.

Handelt es sich um einen Erstkontakt, greifen zunächst die Mechanismen der unspezifischen Abwehr. Entscheidende Bedeutung kommt hierbei den antigenpräsentierenden Zellen (engl. *antigen presenting cells*, APC) zu. Zu diesen zählen, neben Makrophagen und anderen, insbesondere auch die dendritischen Zellen (engl. *dendritic cells*, DC). APC haben die Fähigkeit, mittels Rezeptoren auf ihrer Oberfläche allgemeine, also unspezifische Merkmale zu erkennen, die bei vielen Pathogenen vorkommen und somit deren Identifizierung als körperfremd und potentiell schädlich erlauben, z. B. bakterielle Lipopolysaccharide. Diese von den Rezeptoren der APC erkannten Proteine und molekularen Muster bezeichnet man zusammenfassend auch als pathogenassoziierte molekulare Muster (engl. *pathogen associated molecular patterns*, PAMP), ihre Rezeptoren entsprechend als Mustererkennungsrezeptoren (engl. *pattern recognition receptors*, PRR). Zugleich fungieren DC als Hauptschaltstellen für die Entscheidung, ob der Kontakt mit einem Antigen zu einer Toleranzinduktion führt oder zur Stimulation einer zellulären Immunantwort (Schlosser et al., 2008).

1.1 Zwei Hauptwege der spezifischen Immunreaktion

Spezifische Immunreaktionen werden von den Lymphozyten getragen, die man nach dem Organ ihrer Prägung in B-Lymphozyten (B-Zellen) und T-Lymphozyten (T-Zellen) einteilt. Nach der Aufnahme eines Antigens durch eine APC wird dieses durch Proteinasen in kleine Teile (Epitope) zerlegt, die auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Diese Präsentation dient der Aktivierung von Lymphozyten im Rahmen der humoralen und zellulären spezifischen Immunantwort. Hierzu werden die Epitope auf bestimmte Membranglykoproteine

geladen, die man als Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) bezeichnet. Naive Lymphozyten, die auf ihrer Oberfläche jeweils nur über Rezeptoren einer einzigen Antigenpezifität verfügen, erkennen dieses an ein MHC-Molekül gebundene Epitop und werden dadurch aktiviert. An unterschiedliche Arten MHC gebundene Epitope werden von verschiedenen Lymphozyten erkannt und führen damit zu unterschiedlichen Arten der Immunantwort: Auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentierte Epitope werden von CD4-positiven T-Helferzellen erkannt und führen über die Aktivierung von B-Zellen zu einer humoralen Immunantwort (Doyle und Strominger, 1987), während Epitope auf MHC-Klasse-I-Molekülen naive CD8-positive T-Zellen aktivieren (Zinkernagel, 1996).

Die Aktivierung von B-Zellen bewirkt über deren massenhafte Vermehrung und Differenzierung zu Plasmazellen die Bildung von Antikörpern, die als nichtzelluläre, in Blut oder Lymphflüssigkeit gelöste Bestandteile der spezifischen Immunantwort an Erreger binden und mit ihnen Immunkomplexe bilden. Diese führen, z. B. über die Aktivierung des Komplementsystems und Anlockung neutrophiler Granulozyten, zur Unschädlichmachung des Erregers. Antikörper erkennen nur freie, d. h. nichtzellgebundene Erreger. Mit dem Eindringen in Körperzellen können sich intrazelluläre Erreger somit einem wichtigen Werkzeug der spezifischen Immunabwehr, teilweise sehr erfolgreich, entziehen.

Die Aktivierung von T-Zellen kann dagegen nicht durch freies Antigen erfolgen. Nach Funktion und Phänotyp werden verschiedene T-Zell-Typen unterschieden.

T-Helferzellen weisen an ihrer Zelloberfläche das CD4-Protein auf und koordinieren die Immunreaktion. Sie erkennen Antigene auf MHC-Klasse-II-Molekülen und bewirken je nach Subtyp, daß die zelluläre oder die humorale Immunantwort verstärkt wird (Ahmed et al., 1988; Parker, 1993). Der Name „T-Helferzelle“ leitet sich von der zuerst entdeckten Funktion als Unterstützung für die Produktion von Antikörpern durch Plasmazellen her. Auch regulatorische T-Zellen, deren Funktion die Modulation der Immunantwort ist, haben auf ihrer Oberfläche das Molekül CD4.

Eine weitere Gruppe T-Zellen sind die T-Effektorzellen. Sie tragen auf ihrer Oberfläche das CD8-Molekül und werden durch Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen aktiviert.

1.1.1 Bedeutung und Wirkweise der CD8⁺-T-Zell-Immunantwort

Während die humorale Immunantwort ein effektiver Mechanismus zur Bekämpfung frei vorliegender Erreger ist, entziehen sich ihr neben entarteten körpereigenen Zellen auch manche Erreger (v. a. Viren, aber auch intrazelluläre Bakterien und Parasiten) durch das Eindringen in Körperzellen des Wirtes. Diese „Lücke“ in der Abwehr schließen die CD8⁺-T-Zellen, die als T-Effektorzellen betroffene Zellen erkennen und abtöten, weswegen sie auch „zytotoxische T-Zellen“ genannt werden. Andere Lymphozyten töten die von ihnen erkannten Zellen nicht. Daher kommt bei der Bekämpfung bestimmter intrazellulärer Erreger, insbesondere der Pathogene chronischer Erkrankungen wie z. B. Mykobakterien, HIV und HCV (Westermann et al., 2001), und von Tumoren den zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen die entscheidende Rolle zu.

Wie alle Lymphozyten können auch CD8⁺-T-Zellen mit ihrem an der Zelloberfläche exprimierten Rezeptor, dem T-Zell-Rezeptor (engl. *T-cell receptor*, TCR), nur ein bestimmtes Antigen (genauer: ein Epitop) erkennen, funktionieren also nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip. Wegen der großen Spezifität der TCR liegen diese vor dem ersten Antigenkontakt jeweils nur in einer sehr geringen Zahl vor, die für eine wirkungsvolle spezifische Immunantwort nicht ausreicht.

CD8⁺-T-Zellen erkennen das Antigen ihrer Spezifität nur dann, wenn es ihnen auf einem MHC-Klasse-I-Molekül gebunden präsentiert wird (Zinkernagel, 1996). Diese Voraussetzung nennt man MHC-Klasse-I-Restriktion.

Anders als naive T-Zellen erkennen gereifte T-Effektorzellen die auf der Zelloberfläche betroffener Zellen MHC-Klasse-I-präsentierten Antigene ohne weitere Voraussetzung (Purbhoo et al., 2004) und töten diese Zellen, v. a. mittels Freisetzung von Perforin und Granzymen sowie Fas-Ligand (Berke, 1995; Kägi et al., 1994). Durch ihre Interferon- γ -Produktion, die zugleich Aktivitätsmarker ist (Andreasen et al., 2000), wird die Bildung von MHC-Klasse-I-Molekülen befördert und damit insbesondere die zelluläre Immunantwort weiter verstärkt (Schroder et al., 2004).

1.1.2 Ablauf von T-Zell-Immunreaktionen

Nach ihrer Prägung im Thymus liegen naive CD8⁺-T-Zellen einer Spezifität in den T-Zell-Arealen der Lymphknoten nur in sehr geringer Zahl vor. Erst durch Kontakt mit dem entsprechenden Antigen, dem zumeist eine Wanderung der

durch das Antigen in der Peripherie aktivierten DC vorausgeht, werden die naiven T-Zellen aktiviert, wodurch es zur für adaptive Immunantworten typischen klonalen Expansion dieser $CD8^+$ -T-Zellen kommt. Dadurch werden massenhaft identische Zellen erzeugt, die zu zytotoxischen T-Effektorzellen ausdifferenzieren. Insgesamt allerdings beansprucht die T-Zell-Reifung mindestens vier bis fünf Tage, so daß es bei einem primären Antigenkontakt (Erstinfektion) etwa zehn Tage dauert, bis nach Proliferation der spezifischen $CD8^+$ -T-Zellen eine ausreichende Anzahl spezifisch aktivierter zytotoxischer T-Effektorzellen vorhanden ist, die den Erreger, z. B. ein Virus, mit den genannten Mechanismen wirkungsvoll bekämpfen können (Arens und Schoenberger, 2010). Bis dahin muß sich das Immunsystem mit den Mechanismen der unspezifischen Abwehr behelfen.

Der Großteil, ca. 90-95 %, der T-Effektorzellen ist relativ kurzlebig (Zinkernagel, 1996) und stirbt nach dem Einsatz als zytotoxische T-Zelle durch den programmierten Zelltod (Ahmed und Gray, 1996). Nach dem rapiden Anstieg in der Expansionsphase fällt daher der Anteil von T-Zellen der bestimmten Spezifität in der Kontraktionsphase erheblich ab (Badovinac et al., 2002).

Wie aber auch nach einer B-Zell-Immunreaktion ein Teil der spezifischen B-Zellen erhalten bleibt, um bei erneutem Antigenkontakt eine wirkungsvollere humorale Immunantwort zu leisten, so ist auch ein Teil der aktivierten spezifischen $CD8^+$ -T-Zellen (ca. 5-10 %) von der Apoptose ausgenommen und verbleibt als langlebige Gedächtniszellen (Arens und Schoenberger, 2010) im Blut und in den lymphatischen Organen, z. B. in der Milz. Dadurch ist bei erneutem Antigenkontakt nicht nur bereits eine sehr viel größere Zahl von Lymphozyten der jeweiligen Antigenspezifität vorhanden, vielmehr ermöglichen die besonderen Eigenschaften der Gedächtniszellen (Cho et al., 1999; Veiga-Fernandes et al., 2000) auch eine schnellere und effektivere T-Zell-Immunantwort (Dutton et al., 1998). Diese beruht u. a. darauf, daß T-Gedächtniszellen gegenüber kurzlebigen T-Effektorzellen nicht nur auf geringere Antigenmenge und schneller proliferieren können, sondern auch ein breiteres Zytokinspektrum ausschütten und ein anderes Migrationsverhalten zeigen (Esser et al., 2003; Westermann et al., 2001; Zinkernagel, 1996). Dieses sogenannte „immunologische Gedächtnis“ bewirkt den quantitativen und qualitativen Unterschied zwischen primärer und sekundärer Immunantwort und bedeutet einen entscheidenden Vorteil für die Bekämpfung

eines Erregers, dem der Körper bereits einmal ausgesetzt war.

Die für die Differenzierung einer CD8⁺-T-Zelle entweder zu einer kurzlebigen zytotoxischen T-Effektorzelle oder zu einer langlebigen T-Gedächtniszelle entscheidenden Mechanismen sind nach wie vor nicht aufgeklärt (Zhang und Bevan, 2011). Dadurch, daß Kenntnis über sie vermutlich einen entscheidenden Schritt für die Entwicklung von T-Zell-Vakzinierungen bedeuten würde, gilt ihrer Erforschung großes Interesse (Kim et al., 2012).

1.1.3 Die besondere Bedeutung dendritischer Zellen für die CD8⁺-T-Zell-Immunantwort

Während naive DC vorwiegend in der Peripherie des Körpers vorkommen, wo sie an möglichen Eintrittspforten von Erregern ihre Umgebung auf solche überprüfen, migrieren sie nach Aufnahme von Antigen und einsetzender Reifung in lymphatische Organe, v. a. T-Zell-Zonen von Lymphknoten, wo sie u. a. T-Zellen aktivieren (Steinman, 1991).

1.1.3.1 Costimulation als Erfordernis für CD8⁺-T-Zell-Aktivierung

Voraussetzung für die Aktivierung aller CD8⁺-T-Zellen ist die Präsentation des Epitops ihrer Antigenpezifität auf einem MHC-Klasse-I-Molekül. Diese sind auf nahezu allen kernhaltigen Körperzellen vorhanden (Hamdy et al., 2011). Die primäre Aktivierung einer naiven CD8⁺-T-Zelle bedingt jedoch nicht nur die Präsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen einer professionellen APC (Bevan, 1995), sondern erfordert, neben Adhäsionsmolekülen für die direkte Interaktion von DC und T-Zelle, zusätzliche Stimulation u. a. durch Zelloberflächenproteine auf DC wie z. B. CD40 und CD80/CD86, die auf den T-Zellen u. a. an CD28 binden (Banchereau et al., 2000; Caux et al., 1994). Die genauen Mechanismen sind noch nicht in allen Details bekannt (Thiel et al., 2010). Aber es gilt als gesichert, daß diese auch unter dem Begriff „costimulatorische Impulse“ zusammengefaßte und über die Ausbildung einer immunologischen Synapse vermittelte Produktionsleistung in ausreichender Weise nur von aktivierten DC erbracht werden kann (Benvenuti et al., 2004; Damoiseaux et al., 1998).

Zudem bedarf es für die Aktivierung naiver T-Zellen eines dritten Signals (Curtsinger et al., 1999), das in dem auch, aber nicht ausschließlich von DC produzierten IL-12 (Schmidt und Mescher, 2002) bestehen kann.

Während also die Aktivierung der Effektorfunktionen von T-Zellen ohne immunologische Synapse und Costimulation durch DC erfolgen kann (Lanzavecchia und Sallusto, 2000; Purbhoo et al., 2004), sind diese für die primäre Induktion einer T-Zell-Immunantwort unerlässlich (Hamdy et al., 2011).

1.1.3.2 Unterschiedliche Antigene führen zu unterschiedlicher MHC-Präsentation

Wie auch andere antigenpräsentierende Zellen können dendritische Zellen sowohl exogene als auch endogene Antigene auf MHC-Molekülen präsentieren (Trombetta und Mellman, 2005), wobei aber grundsätzlich verschiedene Wege beschritten werden. Exogene Antigene (z. B. die meisten Bakterien) werden nach phagozytotischer Aufnahme in bestimmten Zellkompartimenten, den endozytotischen Vesikeln oder Endosomen, prozessiert und auf MHC-Klasse-II-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert. Sie führen somit zur Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen. Endogene Antigene (z. B. Zellproteine, tumoröse oder virale Antigene) hingegen werden im Zytosol durch Proteinasen zu Epitopen prozessiert und im endoplasmatischen Retikulum auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen (Hamdy et al., 2011). Diese Unterschiede sind der Grund dafür, daß sich B-Zell- und T-Zell-Immunantworten weitgehend gegen unterschiedliche Erregerspektren richten.

Unter bestimmten Voraussetzungen aber können auch exogene Antigene nach ihrer Aufnahme ins Zellinnere auf einem MHC-Klasse-I-Weg prozessiert werden. Dieser Vorgang mit dem Ergebnis der Präsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen wird zusammenfassend als Kreuzpräsentation (Bevan, 1976) bezeichnet (engl. *cross-presentation*; Heath et al., 2004). Wenngleich auch andere APC Fähigkeit zur Kreuzpräsentation haben, liegt die weitaus höchste Kompetenz hierfür bei den DC (Hamdy et al., 2011).

Unter den Freßzellen, zu denen auch Monozyten zählen, zeichnen sich DC nicht nur durch das faktische Alleinstellungsmerkmal der Kreuzpräsentation, sondern auch durch eine besonders hohe Aufnahmekapazität aus, wobei sie sowohl lösliche als auch partikuläre Antigene aufnehmen können (Lanzavecchia, 1996). Die intrazelluläre weitere Prozessierung und Kreuzpräsentation aber erfolgt bedeutend wirkungsvoller bei mikropartikulären als bei löslichen Antigenen (Heath et al., 2004; Shen et al., 1997).

Diese Kombination von Funktionen macht DC zu den entscheidenden Schaltstellen für die Induktion einer T-Zell-Immunantwort, die in vivo nicht durch andere Zelltypen substituiert werden können (Waeckerle-Men et al., 2006). So konnten beispielsweise DC-depletierte Mäuse keine zytotoxischen T-Zell-Immunantworten gegen *Listeria monocytogenes* und den intrazellulären Parasiten *Plasmodium yoelii* generieren (Jung et al., 2002).

Der Schlüssel zur Induktion primärer T-Zell-Immunantworten liegt also in der Aktivierung dendritischer Zellen.

1.2 B-Zellen und T-Zellen als Grundlage für Vakzinierungssysteme

Daß das Immunsystem auf sekundären Antigenkontakt anders reagiert als auf primären, macht man sich für Vakzinierungen zunutze. So basieren z. B. alle Schutzimpfungen auf diesem Prinzip. Dabei wird der Impfling dem Erreger in einer Weise ausgesetzt, die eine Schädigung ausschließt, trotzdem aber eine spezifische Immunantwort induziert. Grundsätzlich werden Lebend- und Totimpfstoffe unterschieden. Bei ersteren handelt es sich um vermehrungsfähige Erreger, die in einer abgeschwächten (attenuierten) Form und nur in einer solchen Menge verabreicht werden, daß es nicht zu einer Schädigung kommt. Totimpfstoffe hingegen bestehen entweder aus nicht vermehrungsfähigem Antigen (z. B. abgetöteten Bakterien oder replikationsunfähigem Virus) oder nur aus bestimmten immunogenen Teilen des Erregers. Peptidimpfstoffe gehören dementsprechend zu den Totimpfstoffen, die zwar erheblich sicherer, aber auch zumeist deutlich weniger immunogen sind. Im Unterschied zur „passiven Immunisierung“, bei der spezifische Antikörper, die aus anderen Organismen oder künstlich gewonnen wurden, gewissermaßen therapeutisch appliziert werden, wird die Stimulation des Immunsystems des Impflings als „aktive Immunisierung“ bezeichnet. Nur diese ist eine Impfung im engeren Wortsinne und wird auch „Vakzinierung“ genannt. Medizingeschichtlich haben sich Impfungen, v. a. im Rahmen breit angelegter Impfprogramme, zur Bekämpfung von Infektionserkrankungen als wirkungsvollstes Mittel erwiesen, mit dem z. B. Pocken und Kinderlähmung ausgerottet bzw. wesentlich zurückgedrängt wurden (Purcell et al., 2007).

Entsprechend den verschiedenen Mechanismen des erworbenen Immunsystems sind auch die Ansätze für Vakzinierungen verschieden. Der Ansatzpunkt der

meisten bisher etablierten Vakzinierungen richtet sich auf die Induktion einer möglichst starken Antikörperproduktion, also einer wesentlich von T-Helferzellen und B-Zellen getragenen Immunreaktion (Trumpfheller et al., 2012). Das Vorhandensein einer prophylaktischen Wirkung (Impfschutz) bemisst sich dann an der Anzahl der im Blut vorhandenen spezifischen Antikörper (Zinkernagel, 1996). Grundsätzlich eignen sich antikörperbasierte Vakzinierungen gegen eine Vielzahl bakterieller, viraler und toxischer Erreger. Ihre Wirksamkeit stößt aber naturgemäß da an Grenzen, wo es nicht gelingt, den Erreger vor dem Eindringen in Körperzellen unschädlich zu machen. So bleiben bedeutende Infektionserkrankungen wie Malaria, Aids, Tuberkulose und Leishmaniose als bislang ungelöste Herausforderungen für die Entwicklung von Vakzinierungen mit CD8⁺-T-Zellen als entscheidendem Ansatzpunkt (Trumpfheller et al., 2012).

Vakzinierungen auf Basis von T-Zellen sind da gefordert, wo mit den Mitteln der B-Zell-Vakzinierung einem Erreger nicht wirksam begegnet werden kann (Nolz und Harty, 2011). Letzteres wäre grundsätzlich zu bevorzugen, weil es so, anders als bei einer zytotoxischen T-Zell-Antwort, nicht erforderlich wäre, Körperzellen abzutöten. Insofern sollen Vakzinierungen auf T-Zell-Basis kein Ersatz für antikörperbasierte sein, sondern dort zum Einsatz kommen, wo sie über die wirksameren Spezialmechanismen verfügen.

1.2.1 Vakzinierungen gegen Tumoren

Tumorerkrankungen gehören weltweit zu den häufigsten Todesursachen, in Deutschland sind sie die zweithäufigste (Statistisches Bundesamt, 2010). Insofern sich die Abwehrmechanismen des Immunsystems auch gegen entartete körpereigene Zellen richten können, kommen Vakzinierungen auch für den Anti-Tumor-Einsatz in Frage und wurden auch in etlichen klinischen Studien erprobt (Schreiber et al., 2010), bislang allerdings mit sehr mäßigem Erfolg im Sinne klinisch angewandeter prophylaktischer oder therapeutischer Vakzinierungen (Hamdy et al., 2011; Wang und Wang, 2012).

Gegenüber Chemo- und Strahlentherapie, bei denen vielfach durch geringe oder fehlende Spezifität neben den Tumorzellen auch gesundes Gewebe in nicht nur unerheblichem Maße beschädigt wird, liegt ein Vorteil der Immuntherapie in ihrem Potential, Identifikation geeigneter Antigene vorausgesetzt, ein vergleichsweise höheres Maß an Spezifität gegen den Tumor erreichen zu können.

Im Rahmen „passiver Immunisierung“ eingesetzte Effektormoleküle (Casadevall, 1999), brachten bislang allerdings keinen immuntherapeutischen Durchbruch (Hamdy et al., 2011).

Die geeignete Immunantwort gegen entartete körpereigene Zellen ist die Abtötung dieser Zellen durch zytotoxische $CD8^+$ -T-Zellen. Daher liegt in T-Zell-Vakzinierungen der Ansatz zur Immuntherapie gegen Tumoren, der bereits seit mehreren Jahrzehnten klinisch erforscht wird (Wang und Wang, 2012).

Neben der allgemein schwachen Immunogenität von Peptidvakzinierungen (Ma et al., 2012) besteht eine wesentliche Schwierigkeit für die Nutzung der Immuntherapie gegen Tumoren darin, Antigene zu identifizieren, die einerseits die Spezifität des Immunsystems erreichen, durch deren Einsatz aber nicht in unvertretbarem Maße auch gesunde Zellen verletzt werden. Zudem gilt es, die gegen viele Autoantigene bestehende Immuntoleranz wie auch die Mechanismen, mit denen sich Tumoren der Immunantwort entziehen, zu überwinden (Berzofsky et al., 2004).

1.2.2 T-Zell-Vakzinierung mit dendritischen Zellen

Wegen der MHC-Restriktion und der notwendigen Costimulation (s. o.) ist Antigenpräsentation durch aktivierte dendritische Zellen Voraussetzung für die Induktion einer T-Zell-Immunantwort (Jung et al., 2002).

Ein bereits seit längerem verfolgter Ansatz, die Schwierigkeiten der In-vivo-Aktivierung der DC im Patienten zu umgehen, ist die DC-Vakzinierung: Um eine T-Zell-immunogene Präsentation des Peptidantigens zu erreichen, wird dieses in vitro an autologe dendritische Zellen des Patienten gebunden und diese DC nach Beladung mit Antigen wieder appliziert (Inaba et al., 1990). Mit Sipuleucel-T wurde 2010 unter dem Markennamen Provenge® in den USA die erste DC-Vakzinierung von der FDA als Arzneimittel für die Immuntherapie des Prostatakarzinoms zugelassen (Hammerstrom et al., 2011).

Insgesamt haben aber DC-Vakzinierungen erhebliche Nachteile, die ihrer Etablierung in der klinischen Anwendung bisher deutliche Grenzen zu setzen scheinen, v. a. der erhebliche medizinisch-technische Aufwand und die sehr hohen Kosten (Pham et al., 2010). Würden diese in hochentwickelten Ländern mit leistungsfähigen Gesundheitssystemen für die individuelle Tumorthherapie noch vergleichsweise tolerierbar erscheinen, machen sie die Etablierung von DC-

Vakzinierungen in Ländern mit geringer medizinischer Infrastruktur und für massenhafte prophylaktische Impfungen undenkbar. Insbesondere Erkrankungen durch virale und andere intrazelluläre Erreger lassen aber auch für diesen Zweck die Entwicklung von T-Zell-Vakzinierungen dringend geboten erscheinen.

Aus medizinischer Sicht sind die notwendige Gewinnung der DC sowie die Einbringung ex vivo behandelter Transplantate in einen Organismus immer mit Risiken verbunden, die möglichst zu vermeiden sind. Aus immunologischer Sicht ist das verminderte Wanderungsvermögen ex vivo beladener DC von Nachteil (De Vries et al., 2003). Die Gesamtrate der wirklichen klinischen Antworten im Sinne von Tumorregression in Patienten war z. B. mit 7,1 % in einer klinischen Studie enttäuschend gering (Rosenberg et al., 2004).

1.2.3 Unspezifische Immunstimulanzen und ihre Rolle als Adjuvantien in der Vakzinierung

Neben den eigentlichen Antigenen (z. B. Pathogenen oder tumorösen Strukturen), gegen die sich die spezifische Immunantwort des erworbenen Immunsystems richtet, spielen weitere Stoffe in der Vakzinierung eine Rolle, die als Adjuvantien wesentlichen Einfluß auf Stärke und Art der Immunantwort nehmen können.

Eine besondere Gruppe Adjuvantien sind Immunstimulanzen, die nicht über die Spezifität eines B- oder T-Zell-Rezeptors ansprechen können, sondern über unspezifische Stimulation durch Auslösung einer Signalkaskade mit DC-Aktivierung und -Reifung auch die Verstärkung spezifischer Immunantworten bewirken können (Reis e Sousa, 2001). Hierzu werden sie in Vakzinierungen gezielt genutzt. Oft ist eine wirkungsvolle Vakzinierung und damit ein Impferfolg ohne sie nicht möglich (Caskey et al., 2011), insbesondere bei der Nutzung von Peptidantigenen, die an sich nur von schwacher immunogener Wirkung sind (Pham et al., 2010). Zugleich aber bergen Adjuvantien auch die Gefahr von Nebenwirkungen (Steinhagen et al., 2011).

1.2.3.1 TLR-Liganden in der Vakzinierung

Als Bestandteil der angeborenen Immunantwort verfügen antigenpräsentierende Zellen über eine besondere Gruppe Rezeptoren, die „Toll-ähnliche Rezeptoren“ (engl. *Toll-like receptors*, TLR) genannt werden und durch die das Immunsystem mikrobielle Erreger anhand bestimmter allgemeiner Muster erkennen kann (Beutler, 2004).

Liganden der TLR bewirken intrazelluläre Signalkaskaden mit der Folge einer Immunantwort. Dabei aktivieren sie nicht nur die angeborene Immunantwort, sondern nehmen auch Einfluß auf die erworbene (Medzhitov et al., 1997). TLR sind nicht speziesspezifisch, vielmehr scheint es eine hohe phylogenetische Verwandtschaft unter diesen Rezeptoren zu geben (Akira et al., 2006). Allerdings verfügen nicht alle Spezies über das gleiche Repertoire an TLR.

Zusätzliche Bedeutung dieser unspezifischen Immunstimulanzen besonders für Vakzinierungen liegt darin, auch zu einer verbesserten Gedächtnis-Immunreaktion führen zu können (Pulendran et al., 2006). Damit stellen die Liganden der TLR eine besondere Klasse Adjuvanzen dar (Kawai und Akira, 2010).

Die einzelnen TLR werden mit angehängten Ziffern bezeichnet, ihre Liganden entsprechend, z. B. TLR-9 mit seinem Liganden CpG-ODN (oder TLR-9-Ligand).

1.2.3.2 TLR-3-Liganden und ihre Rolle in der T-Zell-Immunantwort

Der TLR-3 erkennt als Pathogenmuster viraler Infektionen doppelsträngige RNS (ds-RNS) und setzt nach Bindung eines Liganden folgerichtig eine Signalkaskade v. a. in CD8⁺-T-Zellen in Gang (Steinhagen et al., 2011). Als synthetisches Analogon viraler ds-RNS fungiert Polyinosin-Polycytidylsäure (Poly(I:C)) und bewirkt über Bindung an den TLR-3 eben diese Immunaktivierung (Alexopoulou et al., 2001; Matsumoto et al., 2002), die zur Produktion inflammatorischer Zytokine und Chemokine wie Interferon, TNF- α , IL-6, und CXCL10 führt. Außerdem wird Poly(I:C) von zytosolischen RNS-Helikasen erkannt (Kato et al., 2006).

Poly(I:C) ahmt aber nicht nur eine virale Infektion nach (Fortier et al., 2004), sondern führt auch zur Apoptose von Tumorzellen und deren vermehrter Aufnahme in DC und damit vermutlich zu einer verbesserten Immunantwort gegen Tumoren (Kovalcsik et al., 2011). Daher gilt dem Potential von Poly(I:C) auch in der Anti-Tumor-Immuntherapie besonderes Interesse (Akasaki et al., 2011; Ren et al., 2011). Auch synergistische Effekte von Poly(I:C) mit anderen TLR-Liganden sind beschrieben (He et al., 2012; Whitmore et al., 2004).

Allgemein gelten TLR-3-Liganden als vielversprechende Adjuvanzen besonders für T-Zell-Vakzinierungen (Steinhagen et al., 2011).

2 Einsatz von Mikrosphären aus PLGA in T-Zell-Vakzinierungsstrategien

Die vorliegende Arbeit umfaßt Untersuchungen über Vakzinierungsstrategien unter Einsatz von Mikrosphären aus Poly(D-, L-(Laktat)-co-Glykolat) (engl. *poly(d, l-lactic-co-glycolic acid)*, PLGA).

2.1 Chemische Grundlagen: Poly(D-, L-(Laktat)-co-Glykolat)

Poly(D-, L-(Laktat)-co-Glykolat) ist eine organische Substanz auf der Basis der Monomere Milchsäure und Glykolsäure. Sie entsteht durch die durch Veresterung erfolgte abwechselnde Konjugation der Monomere und bildet langkettige Copolymerisate aus.

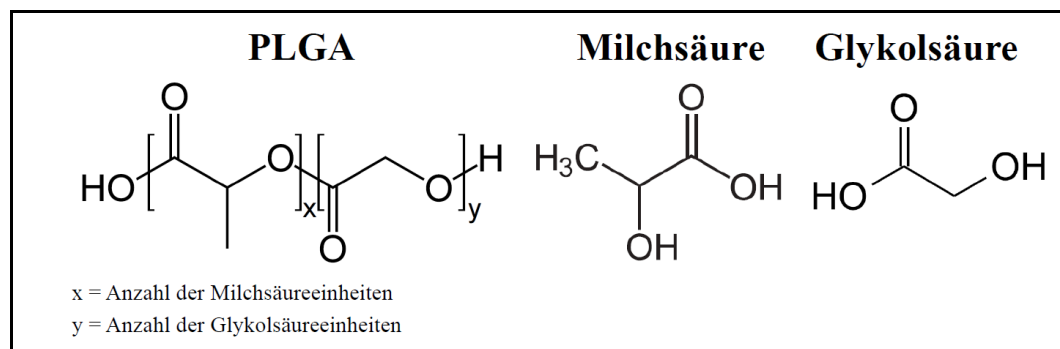


Abbildung 1: Chemische Struktur von PLGA und seinen Monomeren

Das Verhältnis der Monomere zueinander kann dabei je nach den für den Verwendungszweck gewünschten Eigenschaften variieren, ebenso die Länge der Ketten und damit das Molekulargewicht. Insbesondere seine vollständige, aber zeitlich modifizierbare Bioabbaubarkeit macht PLGA zu einem interessanten Stoff für den Einsatz im menschlichen Körper, z. B. als chirurgisches Nahtmaterial, für Implantate u. a. (Makadia und Siegel, 2011).

2.2 Mikrosphären aus PLGA

Wie auch aus anderen Polyestern können aus PLGA Mikro- und Nanopartikel hergestellt werden, vermittle derer Stoffe gebunden und verabreicht werden können.

2.2.1 Definition von PLGA-Mikrosphären

Gemäß Definition der IUPAC sind Polymermikrobiopartikel solche, deren Durchmesser im Größenordnungsbereich von 0,1-100 µm liegt. In Abgrenzung

dazu ist für einen Durchmesser von 0,1-100 nm der Begriff „Polymernanopartikel“ zu verwenden (Slomkowski et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit werden sphärische PLGA-Polymerpartikel mit einem mittleren Durchmesser von 0,2 μm und 2,0 μm (in einem Versuch auch von 20 μm und 250 μm) verwendet, auf die einheitlich unter dem Begriff „Mikrosphären“ (MS) Bezug genommen wird.

2.2.2 Herstellung von PLGA-Mikrosphären

Für die Herstellung von PLGA-Mikrosphären werden verschiedene Methoden angewendet. Die gebräuchlichsten sind die Lösungsmittelverdunstungstechnik und die Sprühtrocknungstechnik (Mundargi et al., 2008).

2.2.2.1 PLGA-MS-Herstellung mittels Lösungsmittelverdunstungstechnik

Bei der Lösungsmittelverdunstungstechnik handelt es sich um ein auf Emulgierung basierendes Verfahren, bei dessen Einsatz PLGA in einem flüchtigen organischen Lösungsmittel (zumeist DCM) gelöst und anschließend in die wässrige Lösung eines Stabilisators (typischerweise PVA) eingebracht wird, in der es gleichmäßige Emulsionströpfchen ausbildet. Durch mehrstündiges Rühren dieser Öl-in-Wasser-Emulsion verflüchtigt sich das Lösungsmittel, und die PLGA-Polymere verfestigen sich zu Partikeln. Mittels Zentrifugation werden schließlich die hergestellten Mikrosphären gewonnen und entweder gefriergetrocknet oder direkt in eine Lösung zur weiteren Verwendung aufgenommen (vgl. Darstellung bei Makadia und Siegel, 2011).

2.2.2.2 PLGA-MS-Herstellung mittels Sprühtrocknungstechnik

Bei der Sprühtrocknungstechnik wird in organischem Lösungsmittel gelöstes PLGA in kleinen Tröpfchen, aus denen die späteren Mikropartikel entstehen, in einen Strom heißer Luft gesprüht. Unter Konstanthaltung der Temperatur verdunstet das organische Lösungsmittel, wodurch die PLGA-Polymertröpfchen zu festen Partikeln aushärten. Über einen Luftstrom gelangen die Partikel in einen Zyklon, in dem Partikel unerwünschter Größe abgesaugt werden (vgl. Darstellung bei Makadia und Siegel, 2011).

Die Größe der PLGA-Mikropartikel wird durch Lösungsmittel, Temperatur und Durchflußrate bestimmt. Wesentlicher Nachteil dieser Methode ist die Adhäsion der Mikrosphären an den Innenwänden des Sprühtrockners. Die Anwendung der

Sprühtrocknungstechnik ist wegen der hohen apparativen Anforderungen und verschiedener technologischer Aspekte für die Herstellung kleiner Mengen nicht üblich und erfolgt v. a. durch spezialisierte Firmen.

Gefriergetrocknete PLGA-MS ohne Additive können von kommerziellen Anbietern in pulverförmigem Zustand bezogen werden und sind über längere Zeiträume lagerungsfähig. Vor ihrer Verwendung sind sie vom Anwender mit der Substanz, für die sie als Trägerstoff dienen sollen, zu beladen.

PLGA-MS sind im Fachhandel in unterschiedlichen Größen, Reinheitsgraden und Molekulargewichten erhältlich. Ein gebräuchliches Molekulargewicht sind 30.000 Dalton bei einem Monomerverhältnis von 50:50.

2.2.3 Beladung der PLGA-Mikrosphären mit Molekülen

Grundsätzlich sind für die Beladung sphärischer PLGA-Mikrobiopartikel zwei Vorgehensweisen zu unterscheiden: Einerseits können die Moleküle durch elektrostatische Kräfte in das Innere des sphärischen PLGA-Körpers eingekapselt werden, andererseits kann chemische Konjugation mittels kovalenter Bindung an die Oberfläche der Mikrosphären erfolgen (vgl. Mahapatro und Singh, 2011).

2.2.3.1 Einkapselung von Molekülen in PLGA-Mikrosphären

Bei der Einkapselung eines Stoffes in die Mikrosphären wird dieser bereits in den Herstellungsprozeß der Mikrosphären einbezogen (Mahapatro und Singh, 2011), indem er entweder, wenn hydrophob, zusammen mit PLGA in dem organischen Lösungsmittel gelöst wird oder, wenn hydrophil, durch einen vorgeschalteten Emulgierungsschritt in Tröpfchen wäßriger Lösung in die PLGA-Lösung eingebracht wird. Entsprechend ergibt sich die Unterscheidung zwischen Einzel- und Doppelemulsionsmethode.

Bei Anwendung der Lösungsmittelverdunstungstechnik ist die Einzelemulsionstechnik Methode der Wahl, wenn wasserunlösliche Arzneimittel (z. B. Steroidhormone) in die MS eingekapselt werden sollen. Für wasserlösliche Substanzen, also z. B. für Peptidantigen bei Vakzinierungen, ist dagegen die Doppelemulsionsmethode einzusetzen (vgl. Makadia und Siegel, 2011).

Bei Anwendung der Sprühtrocknungsmethode ist das einzukapselnde Molekül, ebenfalls in Abhängigkeit von seiner Hydrophilie, entsprechend in die in den heißen Luftstrom eingesprühten PLGA-Lösungsmittel-Tröpfchen einzubringen.

2.2.3.2 Konjugation von Peptidantigen an PLGA-Mikrosphären

Bei der chemischen Konjugation von Molekülen an PLGA-Mikrosphären, für eine Vakzinierung z. B. eines Peptidantigens, wird dieses mit einer funktionellen NH_2 -Gruppe an eine funktionelle COOH -Gruppe des PLGA-Moleküls gebunden. Dies geschieht unter Ausbildung einer kovalenten Amidbindung. Weil die Aminogruppe des Peptids für eine spontane Reaktion zu schwach nukleophil ist, muß diese begünstigt werden, indem die Carboxygruppen des PLGA durch ein saures Milieu und Zugabe eines Carbodiimids (z. B. EDAC) und ggf. zusätzlich NHS aktiviert werden. Nach Zugabe des in wäßriger Lösung gelösten Antigens und anschließender Inkubation ist dieses kovalent an die PLGA-MS gebunden (vgl. Darstellung bei Keegan et al., 2003).

Während zum Zweck gleichmäßiger Wirkstofffreisetzung von Depotarzneimitteln über lange Zeiträume üblicherweise die Einkapselung gewählt wird (Wischke und Schwendeman, 2008), können für Vakzinierungsmodelle grundsätzlich beide Verfahren eingesetzt werden (z. B. Li et al., 2008; Pham et al., 2010).

Aus Gründen technischer Vereinfachung und Reproduzierbarkeit sowie auch mit Blick auf klinischen Einsatz und hierbei erwünschte möglichst standardisierte Verfahren kommen im Rahmen dieser Arbeit kommerziell erworbene Mikrosphären zum Einsatz.

2.2.4 Physiologische Eigenschaften von PLGA-Mikrosphären

Als Polymerester von Milchsäure und Glykolsäure können PLGA-Mikrosphären durch Hydrolyse in ihre Monomere zerlegt werden (Makadia und Siegel, 2011). Diese können im Körper im Zitratzyklus vollständig metabolisiert und letztlich als CO_2 und H_2O ausgeschieden werden. PLGA gehört damit zu den biologisch abbaubaren Substanzen. Wie schnell PLGA im Körper metabolisiert wird, hängt neben anderen Faktoren v. a. vom Monomerverhältnis ab. Generell gilt hierbei, daß Glykolsäure wegen ihrer stärkeren Hydrophilie schneller abgebaut wird (Hamdy et al., 2011). Diese Unterschiede macht man sich insbesondere für den Einsatz in Depotarzneimitteln zunutze. Die schnellste Abbaubarkeit ist allerdings bei einem Monomerverhältnis von 50:50 gegeben (Makadia und Siegel, 2011), das mit Blick auf die Anforderungen einer Vakzinierung auch für die PLGA-MS in dieser Arbeit gewählt wurde.

Für den Einsatz in Vakzinierungsmodellen ist von entscheidender Bedeutung, daß

die PLGA-MS von DC aufgenommen werden können. Gute Phagozytosekapazität der DC für PLGA-MS ist nach unterschiedlichen Quellen in der Größenordnung von 0,5-10 µm beschrieben (Salvador et al., 2012; Waeckerle-Men et al., 2006).

2.2.5 Verwendung von PLGA-Mikrosphären

Mikrosphären aus PLGA sind als Trägersubstanz für Medikamentenapplikation (Depotpräparate) seit Jahren erprobt (Jiang et al., 2005) und mit verschiedenen Applikationsarten (v. a. Injektion s. c.) für den Einsatz im menschlichen Körper zugelassen (Bala et al., 2004; Jain, 2000). Das erste derartige Arzneimittel war das 1989 von der FDA für den Einsatz gegen Prostatakrebs zugelassene Hormonpräparat Lupron Depot® (Okada, 1997).

Verstärkte Aufmerksamkeit erfahren PLGA-Mikrosphären in den letzten Jahren aus immunologischer Sicht mit Blick auf ihr mögliches Potential als Trägersubstanzen für Antigene zur besseren Induktion einer Immunantwort.

2.3 Besondere Bedeutung von PLGA-Mikrosphären für T-Zell-Vakzinierungsmodelle

Ein erhebliches Hindernis für die Entwicklung von T-Zell-Vakzinierungen ist, daß eine primäre T-Zell-Immunantwort nur nach Aufnahme des verabreichten Antigens durch DC erreicht werden kann. Weil es sich bei dem im Rahmen einer Vakzinierung gegebenen Peptidantigen um ein exogenes Antigen handelt, muß zur Induktion einer T-Zell-Immunreaktion sichergestellt sein, daß dieses auf dem Wege der Kreuzpräsentation auf dem MHC-Klasse-I-Molekül einer DC präsentiert wird (siehe Abschnitt 1). Daher wird seit Jahren nach Möglichkeiten gesucht, Antigene in geeigneter Form zu verabreichen. Ein Ansatz, diese Schwierigkeiten zu umgehen, ist die DC-Vakzinierung, die bislang als einzige T-Zell-Vakzinierung im klinischen Einsatz ist, aber auch erhebliche Nachteile hat.

Wie oben dargestellt, ist die Verabreichung gelöster Antigene ungeeignet, um eine ausreichende Aufnahme durch DC und v. a. Kreuzpräsentation zu gewährleisten. Demgegenüber haben sich PLGA-Mikrosphären als geeignet erwiesen, von DC mittels Phagozytose aufgenommen zu werden (Salvador et al., 2012). Sie kommen damit in Betracht, als Trägerstoffe die partikuläre Applikation auch von Peptidantigenen zu übernehmen. Dabei ist entscheidend, daß es, anders als bei der Verabreichung löslichen Antigens, nicht nur zur Aufnahme in die DC, sondern auch zur erforderlichen Antigenprozessierung und Kreuzpräsentation kommt.

Die diesem Unterschied zugrundeliegenden Mechanismen sind noch nicht vollständig geklärt (Hamdy et al., 2011). Eine beschriebene Ursache liegt darin, daß partikulär verabreichte Antigene, anders als exogene Antigene in gelöster Form, nicht schon im Endosom der DC zerlegt werden, sondern dieses verlassen und in hoher Konzentration ins Zytosol gelangen können (Hamdy et al., 2011), was eine Voraussetzung für den „klassischen“, TAP-abhängigen MHC-Klasse-I-Weg (Kovacsovics-Bankowski und Rock, 1995) zu sein scheint. Zudem wird berichtet, daß bei der Antigenverabreichung mittels PLGA-MS mindestens ein TAP-unabhängiger, vakuolärer Prozessierungsweg mit dem Ergebnis der Kreuzpräsentation beschriftet wird (Gerelchuluun et al., 2007). Shen et al. führen die höhere Immunogenität gegenüber löslichen Antigenen nicht nur auf verstärkte, sondern auch auf verlängerte Antigenpräsentation der durch PLGA-MS verabreichten Antigene zurück (Shen et al., 2006). Ein weiterer Aspekt der Antigenverabreichung mittels PLGA-MS könnte sein, daß die Antigenfreisetzung in DC nicht schlagartig, sondern kontinuierlich erfolgt. Damit werde ein Problem umgangen, das sich bei herkömmlichen DC-Vakzinierungen gezeigt habe, nämlich daß die auf DC-Immunisierung erfolgten MHC-Klasse-I-Präsentationen nur von wenigen Stunden Dauer waren (Waeckerle-Men et al., 2006).

Im Ergebnis ist die effektive Kreuzpräsentation mittels PLGA-MS verabreichter Antigene unbestritten. Sie soll in der erreichten Wirkung dem Einsatz von Lebendvektoren wie z. B. Listerien nicht nachstehen (Heit et al., 2007).

Somit sind PLGA-Mikrosphären ein geeignetes Mittel, die Schwierigkeiten der Induktion einer primären T-Zell-Immunantwort an der entscheidenden Stelle zu überwinden.

3 Aspekte für ein innovatives T-Zell-Vakzinierungssystem auf der Basis von PLGA-Mikrosphären

3.1 Ansatz- und Untersuchungspunkte für eine neuartige Vakzinierung

Verschiedene immunologische Aspekte für T-Zell-basierte Vakzinierungen finden Eingang in einen 2010 erstbeschriebenen Ansatz (Pham et al., 2010), dessen wesentliche Innovation in der Kombination von PLGA-Priming und Kurzzeit-Intervall-Boosting mit Pathogen besteht. Aus dem hinsichtlich der T-Zell-Immunantwort beschriebenen Effekt liegt die Weiterentwicklung und -erprobung

zu einem umfassenden PLGA-basierten Vakzinierungskonzept nahe.

3.2 Der „Boosting-Effekt“ für die CD8⁺-T-Zell-Vakzinierung

Der Nutzen jeder Vakzinierung beruht darauf, daß bei erneutem Antigenkontakt des Körpers andere, v. a. auch schnellere und damit wirksamere spezifische Immunreaktionen erfolgen als bei einem Erstkontakt (siehe Abschnitt 1). Prinzip ist dabei, daß die Vakzinierung selbst den primären Antigenkontakt, auch mit dem englischen Begriff „Priming“ bezeichnet, bewirkt, so daß für jeden weiteren, natürlichen oder artifiziellen, Antigenkontakt die Mechanismen der sekundären Immunantwort greifen und damit das „immunologische Gedächtnis“ genutzt wird. Allerdings sind durch Vakzinierungen mit nur einmaliger Antigenapplikation erreichbare Immunreaktionen oft zu schwach, um den gewünschten prophylaktischen oder therapeutischen Erfolg zu erreichen, insbesondere auch eine möglichst lange Wirkungs- und Schutzdauer. Daher werden bei Vakzinierungen mit mehrfacher Antigenapplikation die Vorteile einer sekundären Immunantwort auch bereits für das Vakzinierungsprotokoll selbst genutzt.

Diese gezielte Verstärkung einer primären spezifischen Immunreaktion durch zeitlich versetzte Stimulation mit Antigen oder unspezifischen Immunstimulanzien wird auch mit dem englischen Begriff „Boosting“ (engl. *to boost sth.* = etw. kräftigen, in die Höhe treiben) bezeichnet. Je nachdem, ob es sich bei der zweiten Applikation um eine reine Wiederholung der ersten handelt oder nicht, unterscheidet man homologes und heterologes Boosting (Woodland, 2004).

Der Boosting-Effekt kann für die Verstärkung sowohl von B-Zell- als auch von T-Zell-Immunantworten genutzt werden und ist ein äußerst wirkungsvolles Mittel zur Erreichung hoher Zahlen von Gedächtniszellen (Pham et al., 2010), die insbesondere auch in T-Zell-Vakzinierungen erwünscht sind, weil ihre Zahl mit dem Schutz des Impflings korreliert (Badovinac et al., 2003). Ebenso aber ist bedeutsam für Vakzinierungsstrategien, daß sekundäre und weitere Immunisierungen nicht nur die Anzahl spezifischer T-Zellen erhöhen, sondern auch den zeitlichen Verlauf der Immunreaktion beeinflussen und zu Unterschieden im funktionellen Charakter der Gedächtnis-T-Zell-Population führen (Wirth et al., 2010b), also bei den Zellen, die entscheidend für den Erfolg einer Vakzinierung sind.

Außerdem bewirkt nicht jeder wiederholte Kontakt mit einem Antigen eine verbesserte Immunantwort im Sinne eines längeren oder höheren Schutzes oder therapeutischen Effekts. Daher stellt sich für alle Vakzinierungsansätze, die den Boosting-Effekt nutzen wollen, die Frage nach geeigneten Protokollen mit wiederholter Antigenapplikation nicht nur im Sinne einer möglichst hohen Zahl spezifischer Lymphozyten, sondern auch im Sinne einer optimierten Gedächtnisantwort. Dies gilt besonders auch für CD8⁺-T-Zell-Vakzinierungen (Nolz und Harty, 2011), weil mit nur einmaliger Immunisierung oft kein ausreichender T-Zell-Schutz erreicht wurde (Wirth et al., 2010a).

Neben geeigneter Applikationsart für das Antigen sind dabei insbesondere die Art des Boostings (homolog oder heterolog), die Festlegung des Intervalls zwischen den einzelnen Applikationen und der Einsatz von Adjuvanzen wesentlich (Woodland, 2004). V. a. im Falle raschen therapeutischen oder auch prophylaktischen Bedarfs, z. B. bei Massenerkrankungen oder Bioterrorismus, ist der Aspekt einer möglichst schnell induzierbaren suffizienten Immunreaktion von großer Bedeutung (Pham et al., 2010). Während über Boosting für T-Zell-Vakzinierungen insgesamt noch wenige Studien existieren, liegen die genannten Größenordnungen der meisten bisherigen Protokolle bei mehreren Wochen, meist über einem Monat (z. B. Heit et al., 2007). Teils ist auch eine Vielzahl regelmäßiger Applikationen zur Aufrechterhaltung eines Effekts vorgesehen (Schwarz et al., 2005).

Wie allgemein für T-Zell-Vakzinierungen ist es auch für die Nutzung des Boosting-Effekts entscheidend, mit der primären Stimulation dendritische Zellen zu erreichen. Der Einsatz von PLGA-MS könnte daher auch in Boosting-Ansätzen erfolgen. Die allgemeine Bedeutung des Boosting-Vektors (Hovav et al., 2007) dürfte für PLGA-basierte Strategien indessen in besonderem Maße bestehen, weil PLGA-MS keine PAMP aufweisen.

3.3 *Listeria monocytogenes* in der T-Zell-Vakzinierung: Vektor und Gefahrensignal

Listeria monocytogenes ist ein intrazelluläres Bakterium, das APC, insbesondere Monozyten, aber auch dendritische Zellen befällt. Es ist ein gefürchteter Erreger u. a. von Lebensmittelvergiftungen, findet aber auch als immunologisches Werkzeug Verwendung (Condotta et al., 2012).

3.3.1 Listerien als Vektoren mit T-Zell-Immunogenität

Für die gezielte Induktion von CD8⁺-T-Zell-Immunantworten eignen sich als Vektoren intrazelluläre Pathogene, v. a. Viren, aber auch *Listeria monocytogenes* (LM) (Starks et al., 2004) und Protozoen (Bolhassani und Zahedifard, 2012). Für LM ergibt sich diese Eignung aus allgemein guten immunogenen Eigenschaften und seiner intrazellulären Nische (Bruhn et al., 2007) wie auch aus seiner besonderen CD8⁺-T-Zell-Immunogenität, die aus der Fähigkeit resultiert, APC zu befallen (Lieberman und Frankel, 2002) und ihnen Antigene zu präsentieren. Damit sind LM auch für die Induktion einer primären T-Zell-Immunantwort gegen das von ihnen transportierte Antigen geeignet (Goossens et al., 1995).

Von praktischer Bedeutung ist, daß modellantigenexprimierende LM-Stämme verfügbar sind, z. B. für das in der immunologischen Forschung häufig verwendete Modellantigen Ovalbumin. Auch hohe Tenazität und einfache Handhabung in Kultur machen LM zu einem geeigneten Modellpathogen.

Voraussetzung für die Nutzung eines Pathogens als Vektor in Vakzinierungen sind in ihrer Virulenz geschwächte Erreger (Paterson und Maciag, 2005). Neben anderen ist ein wesentlicher Pathogenitätsfaktor von LM das Oberflächenprotein actA, das durch F-Aktin-Polymerisierung die intrazelluläre Beweglichkeit des Erregers ermöglicht (Pfeuffer et al., 2000). In einer Mutante wurde das actA-Gen deletiert, wodurch das Bakterium außerstande ist, in eukaryotischen Zellen Aktin zu akkumulieren, und sich als Folge nicht mehr von Zelle zu Zelle ausbreiten kann (Le Monnier et al., 2007). Dadurch vermindert sich die Pathogenität drastisch (Goossens und Milton, 1992).

Daher werden in attenuierte Stämme von LM Hoffnungen als Vektoren für T-Zell-Vakzinierungen gesetzt (Peters et al., 2003), insbesondere auch in der Tumorthherapie, nachdem sie in vivo trotz verminderter Überlebensfähigkeit starke gegen das Tumorantigen gerichtete T-Zell-Immunantworten hervorriefen (Wallecha et al., 2009). Dies gilt auch für den Einsatz in Boosting-Strategien, in denen teilweise mit attenuierten LM-OVA ähnliche Immunantworten erzielt werden konnten wie mit virulenten Erregern (Wirth et al., 2010a).

3.3.2 Listerien als Gefahrensignal in Kombination mit PLGA

Alleinige Applikation eines Peptidantigens mittels PLGA ermöglicht zwar dessen Aufnahme in dendritische Zellen, führt aber nicht zu einer wirkungsvollen T-Zell-

Immunreaktion. Als Grund hierfür wird das Fehlen der zur Reifung der DC notwendigen costimulatorischen Signale (s. o.) genannt, weswegen auch der Einsatz von Adjuvantien erforderlich sei (Schlosser, 2007; Waeckerle-Men et al., 2004). Diese bewirken mittels PAMP als „Gefahrensignal“ die Reifung naiver T-Zellen (Schlosser et al., 2008). Eine besondere Rolle kommt hierbei den TLR-Liganden zu (Akira et al., 2006), siehe auch Abschnitt 1.

Neben unspezifischen Immunstimulanzien kommt auch die Verwendung von Pathogenen und ihren PAMP für diese Stimulation in Betracht. So sind beispielsweise neben anderen PRR als Rezeptoren listerieller PAMP auch TLR genannt (Schoen, 2005). Daher könnte *Listeria monocytogenes* besonders für Peptidantigene wegen deren eigener geringer Immunogenität von Interesse sein und eine Alternative zu den für PLGA-basierte Vakzinierungen empfohlenen unspezifischen Adjuvantien darstellen.

3.4 Adjuvantien im Zusammenhang mit PLGA-Vakzinierung

Weil die Verabreichung von Peptidantigen mittels PLGA-MS zwar zur Antigenaufnahme durch DC, nicht aber zu einer befriedigenden T-Zell-Immunantwort durch klonale Expansion von CD8⁺-T-Zellen führt (s. o.), wurde sie diversen Studien mit einem immunstimulatorischen Adjuvans, oft einem TLR-Liganden, ergänzt (z. B. Fischer et al., 2009; Zhang et al., 2007). Dabei wurde der TLR-Ligand teils mit kovalenter Bindung an das Antigen, teils auch gemeinsam mit dem Antigen eingekapselt gegeben (Heit et al., 2008), wobei die partikuläre Applikation eines TLR-Liganden mittels PLGA-MS deutlich wirkungsvoller war als in gelöster Form, besonders wenn dieser in dieselben MS eingeschlossen war wie das Antigen (Schlosser et al., 2008).

Allerdings beziehen sich diese berichteten Ergebnisse mit Adjuvantien zumeist auf die Stärke primärer T-Zell-Immunantworten (Schlosser et al., 2008) oder auf Protokolle, bei denen ein homologes Boosting mit PLGA-gebundenem Antigen nach mehreren Wochen, z. B. 35 Tagen (Heit et al., 2007) erfolgte. Für einen heterologen Kurzzeit-Boosting-Ansatz mit Pathogen liegen Erkenntnisse über die Auswirkungen einer zusätzlichen Gabe von TLR-Agonisten im Priming kaum vor. Es wird lediglich über eine negative Auswirkung von LPS-Gabe zum Priming-Zeitpunkt berichtet (Pham et al., 2010). Ähnliches ergab sich für Adjuvantieneinsatz in einem Ansatz, bei dem auf DC-Priming ein Boosting

erfolgte (Badovinac et al., 2005).

Wenn auch bei skeptisch zu beurteilendem Erfolg im Sinne einer Steigerung der sekundären T-Zell-Immunantwort empfiehlt sich die genauere Untersuchung von TLR-Liganden auch im Zusammenhang mit einem Kurzzeit-Intervall-Boosting.

4 Zielsetzung für die vorliegende Arbeit

In Abwägung des dargelegten derzeitigen wissenschaftlichen Erkenntnisstandes sowie angesichts des klinischen Bedarfs sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit *in vivo* ein CD8⁺-T-Zell-Vakzinierungsmodell mit wiederholtem Antigenkontakt standardisiert und in Richtung der Etablierung für den Einsatz im Menschen untersucht und weiterentwickelt werden. Besondere, aber nicht ausschließliche Berücksichtigung sollte dabei das Ziel der therapeutischen Einsetzbarkeit gegen Tumoren finden. Wesentliche Kennzeichen des eingesetzten Modells sind partikuläre Verabreichung von Peptidantigen durch Konjugation an PLGA-Mikrosphären sowie sekundäre Antigenverabreichung als starkes Boosting zur Induktion eines hohen Anteils von T-Gedächtniszellen mit der Folge einer möglichst langen Wirkung der Immunreaktion. Mit dem Ziel schneller Erreichung therapeutisch und prophylaktisch nutzbarer T-Zell-Immunantworten sollte nur ein sehr kurzes Intervall (7 Tage) zwischen erster und zweiter Antigengabe liegen.

Bei unterschiedlichen Applikationsreihenfolgen und -kombinationen von PLGA-gebundenem Antigen einerseits und Pathogen andererseits war zunächst grundsätzlich zu klären, welches Protokoll für die Nutzung des Boosting-Effekts im direkten Vergleich tatsächlich am besten geeignet ist. Zur Etablierung eines Standards für die durchzuführenden Untersuchungen sollte weiterhin der Einfluß der im Priming verwendeten Antigenmenge festgestellt sowie auch der phänotypische Charakter der generierten spezifischen CD8⁺-T-Zell-Populationen über den zeitlichen Verlauf bis in die Gedächtnisphase genauer analysiert werden.

Das entsprechend festgelegte Standardprotokoll mit PLGA-MS war weiterhin im Vergleich zu analogem Einsatz dendritischer Zellen zu untersuchen und zu beurteilen, weil DC-Vakzinierungen gegenwärtig der Standard sind, an dem neue Ansätze für die Generierung von T-Zell-Immunantworten gemessen werden müssen.

Um die Einsatzbreite des untersuchten Vakzinierungsmodells, insbesondere auch

mit dem Gedanken an seine erwünschte Immunogenität auch mit Tumorlysat, zu beleuchten sowie eventuelle Ansätze für Verbesserungen zu identifizieren, wurde der Einfluß von Veränderungen in der PLGA-Antigenapplikation hinsichtlich folgender Aspekte untersucht: Verabreichungsweg, Länge des an PLGA gebundenen Antigens, Größe der eingesetzten Mikrosphären.

Adjuvanzieneinsatz wird einerseits für PLGA-basierte Vakzinierungen vielfach als unbedingt erforderlich genannt, andererseits liegen, abgesehen von einzelnen, wenn auch eher weniger ermutigenden Berichten, keine allgemeinen Erkenntnisse über zusätzliche Gabe von Immunstimulanzien in Kombination mit einem Kurzzeit-Pathogen-Boosting vor. Daher sollte untersucht werden, ob sich der Wert eines eingesetzten Boosting-Konzepts allein aus der Verbesserung der T-Zell-Immunantworten gegenüber bisherigen homologen PLGA-Vakzinierungsprotokollen mit Adjuvanzieneinsatz als potentere Alternative ergibt oder ob darüber hinaus auch eine synergistische Wirkweise in Betracht kommt.

Ebenfalls mit Blick auf erwünschten therapeutischen Einsatz von T-Zell-Vakzinierungen gegen Tumoren sollte die Modellstufe mit einem Fremdanigen nach entsprechender Erprobung verlassen werden. Dazu wurde das entwickelte Protokoll in einem weiteren wesentlichen Entwicklungsschritt auf seine grundsätzliche Eignung zur Induktion spezifischer Immunantworten auch gegen unmutierte Autoantigene getestet, indem es in genetisch veränderten Tieren angewendet wurde, die organspezifisch das Modellantigen exprimierten.

Ziel war es, einen Beitrag zur Umsetzung eines beschriebenen vielversprechenden immunologischen Effekts und Vakzinierungsansatzes in ein praktikables und umfassenderes System zu leisten, das im Falle seiner praktischen Anwendbarkeit nicht nur großen medizinischen Nutzen gegenüber den derzeitigen Möglichkeiten bedeuten könnte, sondern auch erhebliche technologische und Kostenvorteile.

II MATERIAL UND METHODEN

1 Material

1.1 Verbrauchsmaterialien

Folgende Verbrauchsmaterialien wurden von den jeweils nebenstehend genannten Herstellern bezogen:

Aspirationspipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalkanülen (27G, 25G)	Braun, Melsungen
Einmalspritzen (verschiedene Größen)	Braun, Melsungen
End-zu-End-Kapillaren (20 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturflaschen (25 cm ² , mit Belüftungskappe)	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturflaschen (75 cm ² , mit Schraubverschluß)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gewebekulturplatten (6 oder 12 Kavitäten)	Sarstedt, Nümbrecht
Hämatokritkapillaren (heparinisiert, 75 µl)	Hirschmann, Eberstadt
Küvetten zur OD-Bestimmung	Sarstedt, Nümbrecht
MACS-Säulen	Miltenyi Biotec, Berg. Gladbach
Mikroreaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplatten (96 Kavitäten, V-Form)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Nylon-Zellsiebe (40 µm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen (verschiedene Größen, mit und ohne Filter)	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylenröhrchen mit Schraubdeckel (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Probenröhrchen für Durchflußzytometrie	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

1.2 Geräte

Es wurden folgende Geräte der jeweils nebenstehenden Hersteller verwendet:

Bakterienschüttler: Universalschüttler (SM 30) mit Inkubationshaube (TH 30)	Edmund Bühler, Hechingen
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Feinwaage (BP 221 S)	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzdurchflußzytometer (FACS-Canto™ II)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kühlzentrifuge (Megafuge 1.0R)	Heraeus, Hanau
Magneten für MACS	Miltenyi Biotec, Berg. Gladbach
Mehrkanalpipette	Labnet, Edison, NJ, USA
Mikropipetten (variable Volumina, verschiedene Größen)	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop zur Zellzahlbestimmung (Wilovert S)	Hund, Wetzlar
Photometer (Libra S12)	Biochrom, Berlin
Pinzetten (diverse)	Roth, Karlsruhe
Pipettierhilfe	Hirschmann, Eberstadt
Scheren (diverse)	Roth, Karlsruhe
Thermoschüttler (Thermomixer Comfort 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge (5415 C)	Eppendorf, Hamburg
Vortexer (VM 300)	NeoLab Migge, Heidelberg
Waage (LC 220 S)	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zählkammer nach Neubauer improved, incl. Hämacytometer-Deckgläser	Brand, Wertheim
Zellkulturschrank (NU-2700)	Nuaire, Plymouth, MN, USA

1.3 Chemikalien und Reagenzien

1.3.1 Antikörper

Folgende, teilweise fluorochromkonjugierte, Antikörper (Bezeichnung des Klon in Klammern) wurden von den jeweils nebenstehenden Herstellern bezogen.

anti-Maus-CD4-APC (GK 1.5)	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-CD8a-FITC (53-6.7)	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-CD8a-PE (53-6.7)	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-CD11a-PE (M17/4)	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-CD27-PE (LG.7F9)	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-CD62L-PE (MEL-14)	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-CD127-PE (A7R34)	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-IFN- γ -APC (XMG1.2)	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-IL-2-PE (JES6-5H4)	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-KLRG1-PE (2F1)	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA
anti-Maus-TNF- α -PE (MP6-XT22)	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-Maus-CD16/CD32 (2.4G2) als blockierender Antikörper (Fc-Block™)	Becton Dickinson, Heidelberg
Armenischer Hamster-IgG-PE (eBio299Arm) zur Isotyp-Kontrolle	eBioscience, San Diego, CA, USA
Ratte IgG-2a- κ -PE (eBR2a) zur Isotyp-Kontrolle	eBioscience, San Diego, CA, USA

1.3.2 Ausstattung mit Lösungen zur Zellfixation und -permeabilisation

Im Rahmen der Färbung mit intrazellulär bindenden Antikörpern wurde eine Zellfixierungs-Zellpermeabilisierungs-Lösungsausrüstung mit Zellfixierungs-Zellpermeabilisierungslösung (Cytofix/Cytoperm™), Permeabilisierungs-Waschpuffer (Perm/Wash™) und Proteintransportinhibitor (GolgiPlug™) der Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, verwendet.

1.3.3 Lösungen für die Färbung mit intrazellulären Antikörpern

Im Rahmen der intrazellulären Färbung wurden folgende Lösungen eingesetzt:

SIINFEKL-GolgiPlug™-Stimulationslösung

8 ml RPMI-Medium vorlegen, 16 µl GolgiPlug™ und 32 µg SIINFEKL-Peptid hinzupipettieren, unmittelbar nach Ansetzen verwenden.

GolgiPlug™-Lösung ohne Peptidantigen (für Negativkontrolle)

8 ml RPMI-Medium vorlegen, 16 µl GolgiPlug™ hinzupipettieren, unmittelbar nach Ansetzen verwenden.

1.3.4 Lösungen für die Isolierung dendritischer Zellen

FLT3-Ligand-Lösung

Zwei Teile RPMI + 10 % FCS und 1% PS mit einem Teil Mediumüberstand aus einer FLT3-Ligand-exprimierenden B16-Zellkultur mischen, dazu je 3 ml Ansatz 50 µl GM-CSF-Lösung hinzugeben.

GM-CSF-Lösung

GM-CSF-Lösung wurde aus dem Medium-Zellüberstand aus Zellkulturflaschen von EL4-Zellen gewonnen und freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. F. Kühnel (Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt.

Verdaumedium

1 ml Kollagenase I/IV (Verhältnis 50:50, 10 mg/ml), 0,3 ml Desoxyribonuklease (10 mg/ml), 0,3 ml Dispase (50 mg/ml) und 1 ml Hyaluronidase (10 mg/ml) mit RPMI auf ein Volumen von 50 ml auffüllen.

1.3.5 Rezepturen

Folgende Puffer und Lösungen wurden nach den angegebenen Rezepturen selbst angesetzt:

Erythrozytenlysepuffer

4,14 g NH₄Cl, 0,5 g KHCO₃ und 0,1 mM EDTA in ddH₂O lösen und auf ein Volumen von 500 ml auffüllen, anschließend sterilfiltrieren.

FACS-Puffer

500 ml PBS (steril) mit 5 ml FCS (1 %) und 0,5 g NaN_3 (0,1 %) sowie 2 mM EDTA mischen.

MACS-Puffer

500 ml PBS (steril) mit 5 ml FCS (1 %) und 5 ml Penicillin-Streptomycin (1 %) sowie 2 mM EDTA mischen.

MES-Puffer (50 mM, pH 5,2)

9,76 g MES in 500 ml ddH_2O lösen, mit 1 M NaOH pH-Wert auf 5,2 einstellen, mit ddH_2O auf ein Gesamtvolumen von 1 l auffüllen.

PBS (steril)

1 Teil PBS (10fach) mit 9 Teilen ddH_2O mischen, anschließend sterilfiltrieren.

PBS + 15 % FCS, PBS + 10 % FCS, PBS + 5 % FCS

Zu 500 ml PBS 75 ml bzw. 50 ml bzw. 25 ml FCS hinzugeben.

RPMI-Medium + 10 % FCS + 1% PS

Zu 500 ml RPMI-1640-Medium 50 ml FCS und 5 ml Penicillin-Streptomycin hinzugeben.

TRIS-Puffer (10 mM, pH 8,0)

10 mM TRIS in ddH_2O lösen und auf 1 l auffüllen, anschließend pH-Wert mit HCl einstellen.

TSB-Medium

17 g Caseinpepton, 3 g Sojamehlpepton, 5 g NaCl, 2,5 g Dextrose und 2,5 g K_2HPO_4 in ddH_2O lösen und auf ein Volumen von 1 l auffüllen.

1.3.6 Peptide

Peptide mit den Aminosäuresequenzen SIINFEKL (Pos. 257-264 von Ovalbumin) sowie GLEQLESIINFEKLTEWTSS (Pos. 251-270 von Ovalbumin) wurden von der Fa. ProImmune, Oxford, UK, bezogen.

1.3.7 Sonstige Chemikalien und Reagenzien

Folgende sonstige Chemikalien und Reagenzien wurden von den jeweils nebenstehend genannten Herstellern bezogen.

anti-CD11c-Mikromagnetpartikel	Miltenyi Biotec, Berg. Gladbach
Caseinpepton	Sigma-Aldrich, Steinheim
ddH ₂ O	Zentralapotheke der MHH
Desoxyribonuklease	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dextrose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dispase	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO (endotoxinfrei)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
FCS	Lonza, Verviers, B
HCl	Merck, Darmstadt
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, Steinheim
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
KHCO ₃	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kollagenase I/IV	Sigma-Aldrich, Steinheim
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim
LPS	Sigma-Aldrich, Steinheim
MES	Sigma-Aldrich, Steinheim
NaCl	Merck, Darmstadt
NaCl-Lösung (0,9 %, steril)	Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H.
NaN ₃	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ovalbumin	Hyglos, Bernried am Starnberger See
PBS (10fach)	Life Technologies, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin	Biochrom, Berlin
Pepstatin	Sigma-Aldrich, Steinheim
PLGA-Mikrosphären	Phosphorex, Hopkinton, MA, USA
Poly(I:C), hohes Molekulargewicht	Invivogen, San Diego, CA, USA
RPMI-1640 + Glutamax TM -I + HEPES (25 mM)	Life Technologies, Darmstadt

SIINFEKL-H-2K ^b -Monomer, biotinyliert	Glycotope Biotechnology, Heidelberg
Sojamehlpepton	Sigma-Aldrich, Steinheim
Streptavidin-APC	eBioscience, San Diego, CA, USA
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
TRIS	Applichem, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H.

1.4 Versuchstiere

Alle verwendeten Versuchstiere waren Mäuse. Soweit nicht anders angegeben, wurden Wildtyp-Tiere (WT) des Stamms C57BL/6J von der Fa. Charles River, Sulzfeld, verwendet. Dieser Stamm exprimiert den MHC-Klasse-I-Haplotyp H-2K^b.

In dem in Abschnitt III.8 dargestellten Versuch wurden auch genetisch veränderte Tiere des Stamms B6.Cg-Tg(Alb-Cre)21Mgn/J verwendet, die von der Fa. Charles River, Sulzfeld, bezogen wurden (Gruppe 3), außerdem des auf C57BL/6J-Tieren basierenden Stamms OVA-AgZ (Gruppe 2; Züchtung von Frau Dr. D. Wirth, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig; Beschreibung siehe bei Sandhu et al., 2011) sowie eine Kreuzung aus Tieren dieser beiden Stämme, die in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. F. Kühnel (Medizinische Hochschule Hannover) gezüchtet und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde (Gruppe 1).

1.5 Bakterien

Bei den verwendeten Bakterien handelte es sich um einen durch Ausschaltung des Virulenzfaktors *actA* attenuierten OVA-exprimierenden Stamm von *Listeria monocytogenes* (basierend auf einer Konstruktion von Prof. H. Shen, Ph.D., University of Pennsylvania, School of Medicine, Philadelphia, PA, USA; Beschreibung siehe bei Pope et al., 2001 sowie bei Wirth et al., 2010b; freundlicherweise zur Verfügung gestellt aus dem Labor von Prof. J. Harty, Ph.D., Department of Microbiology, University of Iowa, Iowa City, IA, USA), auf den in der vorliegenden Arbeit als „LM-OVA“ Bezug genommen wird. Er verfügt über Resistenz gegenüber Streptomycin.

1.6 Zelllinien

Für die Gewinnung dendritischer Zellen aus Milzzellessat wurden FLT3-L-sezernierende Zellen der Zelllinie B16, einer murinen Melanomzelllinie, verwendet, die freundlicherweise aus dem Institut von Prof. M. J. Bevan, Ph.D., F.R.S., Department of Immunology, University of Washington, Seattle, WA, USA, zur Verfügung gestellt wurden.

2 Methoden

2.1 Biochemische, zellbiologische und mikrobiologische Methoden

2.1.1 Konjugation von Peptidantigen an PLGA-Mikrosphären

Für die Applikation von Peptidantigen mittels PLGA-MS wurden Mikrosphären der Fa. Phosphorex (Hopkinton, MA, USA) mit einem PLGA-Molekulargewicht von 30.000 Dalton und einem Verhältnis der Monomere Milchsäure und Glykolsäure von 50:50 verwendet. Die Beladung mit Peptidantigen wurde entsprechend einem vom Hersteller zur Verfügung gestellten Protokoll durchgeführt. In allen Versuchen wurden die PLGA-MS-Mengen so gewählt, daß je Tier 1 mg PLGA injiziert wurde. Die benötigte Menge wurde entsprechend mit Feinwaage abgewogen und in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben. Dazu wurden 200 µl MES-Puffer (50 mM; pH 5,2) je 10 mg PLGA-MS gegeben, das Mikroreaktionsgefäß anschließend vorsichtig invertiert. Von einer unmittelbar vorher hergestellten EDAC-Lösung (200 mg/ml in 50 mM MES-Puffer (pH 5,2)) wurden je 10 mg PLGA-MS 20 µl zu der PLGA-MS-MES-Puffer-Lösung hinzugegeben, anschließend das Mikroreaktionsgefäß wieder vorsichtig invertiert. Danach wurde das an die MS zu konjugierende Antigen (gelöst in DMSO in einer Konzentration von 4 mg/ml) hinzupipettiert. Es folgte ein kurzes Mischen unter Zuhilfenahme des Vortexers. Der so hergestellte Ansatz wurde bei 25° C über 3 h bei 450 U/min auf dem Thermoschüttler inkubiert und danach in der Tischzentrifuge bei Raumtemperatur 5 min bei 8.000 U/min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in TRIS-Puffer (10 mM, pH 8,0), resuspendiert und bei gleichen Einstellungen erneut zentrifugiert. Sodann wurde wieder der Überstand abgesaugt und der Waschvorgang wiederholt. Danach wurde das Pellet in NaCl-Lösung aufgenommen (200 µl sterile 0,9 %-NaCl-Lösung je 1 mg PLGA-MS). Daraus ergibt sich ein Injektionsvolumen von 200 µl je Tier und Applikationseinheit.

2.1.2 Isolierung und Antigenbeladung dendritischer Zellen

Die im Rahmen dieser Arbeit in DC-Vakzinierungen verabreichten dendritischen Zellen wurden aus C57BL6/J-Mäusen als Spendertieren gewonnen, mit Antigen beladen und anschließend in Empfängertiere transferiert.

2.1.2.1 Gewinnung von Milzzellysat und Antigenbeladung der Zellen

Nachdem zwei Wochen vor dem geplanten Applikationstermin durch Injektion von FLT3-L-exprimierenden B16-Zellen in einem DC-Spendertier (C57BL6/J-Maus) ein subkutaner Tumor (Melanom) induziert worden war, wurde das Tier nach i. v.-Gabe von 2 µg LPS getötet, die Milz entnommen und in der Vertiefung einer 6-Kavitäten-Gewebekulturplatte in 3 ml FACS-Puffer aufgenommen. Nach der Entfernung von Mesenterium und Anhängen wurde das Organ in die Vertiefung einer 12-Kavitäten-Gewebekulturplatte gelegt. Anschließend wurde mit einer 25 G-Kanüle 1 ml Verdaumedium, das zuvor auf 37 °C erwärmt worden war, in mehrere Stellen der Milz gespritzt, bis diese unter erkennbarer Bildung kleiner Bläschen Zellen abgab. Danach wurde die Milz in Stücke geschnitten und 20 min lang bei 37° C und 120 U/min inkubiert. Milzstücke und Lösung wurden anschließend durch ein 40 µm-Nylon-Zellsieb in ein 50 ml-Röhrchen filtriert, das mit PBS auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt und 10 min bei 4 °C und 1.200 U/min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Pellet in 1 ml PBS aufgenommen, dann 9 ml Erythrozytenlysepuffer zugegeben und der Ansatz 1 min inkubiert. Nach der Zugabe von 40 ml PBS erfolgte Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 1.200 U/min. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 50 ml RPMI + 10 % FCS und 1 % PS aufgenommen und 10 min bei 4 °C und 1.200 U/min zentrifugiert.

Das entstandene Pellet wurde in 10 ml FLT3-L-Lösung aufgenommen, die so erhaltene Zellsuspension in eine 25 cm²-Gewebekulturflasche mit Belüftungskappe überführt.

2.1.2.2 Isolierung der dendritischen Zellen und Herstellung des Ansatzes für die Injektion in die Versuchstiere

Zu der hergestellten Zellsuspension wurde das an die DC zu bindende Antigen (SIINFEKL-Peptid) im Verhältnis 1:500 aus einer 1 mM Vorratslösung hinzupipettiert und der Ansatz anschließend 2 h bei 37 °C unter einem CO₂-Gehalt von 5 % im Zellkulturschrank inkubiert, währenddessen alle 10 min

vorsichtig manuell geschwenkt.

Danach wurde die Suspension in ein 50 ml-Röhrchen überführt, mit PBS einer Temperatur von 4 °C aufgefüllt und 10 min bei 4 °C und 1.200 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml PBS + 10 % FCS einer Temperatur von 4 °C aufgenommen, dann die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Nach Zugabe weiterer 15 ml PBS + 10 % FCS einer Temperatur von 4 °C und nochmaliger Zentrifugation bei gleichen Einstellungen wurde das Pellet in 1 ml PBS + 5 % FCS aufgenommen, 10 µl Fc-Blocker zugegeben, danach der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert.

Dann erfolgten die Zugabe von 150 µl anti-CD11c-Mikromagnetpartikeln und 15 min Inkubation bei 4 °C. Das nach Zugabe von 14 ml PBS + 15 % FCS und Zentrifugation (10 min bei 4 °C und 1.200 U/min) entstandene Pellet wurde in 5 ml MACS-Puffer aufgenommen und auf eine zuvor mit 3 ml MACS-Puffer äquilibrierte und in den zugehörigen Magneten gehängte MACS-Säule gegeben und mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Nach dem Durchlaufen der Flüssigkeit und Entfernung der Säule vom Magneten wurden 5 ml MACS-Puffer auf die MACS-Säule gegeben und mit dem entsprechenden Stempel durch die Säule gedrückt. Der die DC enthaltende Durchlauf wurde aufgefangen.

Nach Bestimmung der Zahl der DC und erneuter Zentrifugation wurden diese in 0,9 %-NaCl-Lösung aufgenommen und daraus eine Injektionslösung hergestellt, die in 200 µl (Injektionsvolumen je Tier) ca. 10^6 dendritische Zellen enthielt.

2.1.3 Herstellung von Listeria-Bakteriensuspensionen

Die in Abschnitt 1.5 beschriebenen Bakterien der Gattung Listeria wurden aus einem bei -80 °C gelagerten Aliquot (1 ml) bei Raumtemperatur aufgetaut und in 10 ml TSB-Medium gegeben, das 1:1.000 mit Streptomycin versetzt war. Die verwendeten Listerien verfügten über Resistenz gegenüber Streptomycin. Dieser Ansatz wurde bei 37 °C und 220 U/min inkubiert, bis bei einer Wellenlänge von 600 nm eine optische Dichte (OD) von ca. 0,080 erreicht war. Entsprechend der benötigten Zahl Bakterien wurde das errechnete Volumen aus dem Ansatz entnommen und in einem Mikroreaktionsgefäß bei Raumtemperatur und 13.000 U/min 3 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert, anschließend der Überstand abgesaugt und das Bakterienpellet in steriler 0,9 %-NaCl-Lösung resuspendiert. Das Volumen für die Herstellung der Injektionslösung wurde so

gewählt, daß jedes Tier 200 µl Bakteriensuspension erhielt.

2.1.4 Herstellung von SIINFEKL-H-2K^b-Tetramer-APC

SIINFEKL-H-2K^b-Tetramer-APC-Konjugat wurde hergestellt, indem zu 100 µg biotinyliertem SIINFEKL-H-2K^b-Monomer 212,5 µl Streptavidin-APC (0,2 mg/ml) in zehn etwa gleich großen Einzelvolumina hinzupipettiert wurde. Die Zugabe der ersten Hälfte dieser Einzelvolumina erfolgte im Abstand von jeweils 5 min, die der restlichen im Abstand von jeweils 10 min. Nach jeder Zugabe erfolgten kurzes Vortexen und anschließende Inkubation bei Raumtemperatur und unter Vermeidung von Lichteinwirkung.

Anschließend wurden zur Proteinaseinhibition und Lagerung 2 µl NaN₃ (30 %ig), 4 µl EDTA (0,5 M), 1 µl Pepstatin (2 mg/ml) und 1 µl Leupeptin (2 mg/ml) hinzugegeben. Mittels Testfärbungen von Blutproben aus Mäusen wurde eine geeignete Konzentration für die antigenspezifische Färbung mit möglichst geringem Hintergrundrauschen bestimmt. Sie betrug 1:200.

2.2 Durchführung der Tierversuche

Alle Tierversuche wurden an Mäusen entsprechend den gültigen Tierschutzbestimmungen im Zentralen Tierlaboratorium der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden vom niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit mit der Nummer 10/0080 genehmigt.

2.2.1 Haltung der Tiere

Die Mäuse wurden in einem Raum der Sicherheitsstufe S2 unter kontrollierten und standardisierten Umweltbedingungen bei einer Raumtemperatur von 22 ± 2 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 55 ± 5 % in Mausekäfigen des Standardtyps II SL (Typ 22) aus Polysulfon auf staubfreiem Weichholzgranulat gehalten. Eine Beleuchtungsanlage sorgte für einen Hell-Dunkel-Rhythmus mit einer Hellphase von 14 Stunden täglich. Die Tiere wurden mit einem pelletierten Alleinfuttermittel für Versuchstiere (Altromin 1324 TPF, Fa. Altromin, Lage) ernährt, das ebenso wie Wasser ad libitum zur Verfügung stand.

Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Tiere hinter einer Infektionsbarriere gehalten. Der für die Versuche erforderliche Gesundheitsstatus

wurde durch regelmäßige serologische, bakteriologische und parasitologische Untersuchungen entsprechend der GV-SOLAS-Liste gewährleistet.

2.2.2 Applikationstechniken

Injektionen i. v. erfolgten mit einer sterilen 27 G-Einmalkanüle in die Schwanzvene.

Injektionen i. m. erfolgten mit einer sterilen 27 G-Einmalkanüle in den Oberschenkelmuskel.

Injektionen s. c. erfolgten mit einer sterilen 25 G-Einmalkanüle im Bereich der Flanke.

Injektionen i. p. erfolgten mit einer sterilen 27 G-Einmalkanüle in die untere Hälfte des Abdomens.

2.2.3 Probengewinnung

Das den Mäusen entnommene Blut wurde entweder durch Punktion des retrobulbären Venenplexus mit einer Hämatokritkapillare oder durch Punktion der Vena facialis mittels einer sterilen Einmalkanüle gewonnen und unmittelbar danach in RPMI-Medium + 10 % FCS aufgenommen und auf Eis gelagert und transportiert.

Milzen wurden unmittelbar nach Tötung der Tiere und ventraler Öffnung der Bauchhöhle mit Skalpell und Schere freipräpariert, Anhänge wurden entfernt. Sie wurden unmittelbar danach in RPMI-Medium + 10 % FCS gegeben und auf Eis gelagert und transportiert.

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 Aufbereitung und Färbung von Leukozyten für die durchflußzytometrische Analyse

2.3.1.1 Blutproben

Das Blut wurde unmittelbar nach Entnahme in 1,5 ml mit RPMI-Medium + 10 % FCS in einem 15 ml-Röhrchen aufgenommen, durch Invertieren gemischt und anschließend auf Eis gelagert und transportiert.

Um die Leukozytenfraktion analysieren zu können, wurde zu jeder Probe 5 ml

Erythrozytenlysepuffer gegeben, der nach 7 min Einwirkzeit durch Hinzupipettieren von 5 ml FACS-Puffer inaktiviert wurde. Anschließend wurde die Probe 10 min bei 4 °C und 1.200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das am Boden verbliebene Zellpellet in ca. 0,5 ml FACS-Puffer resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden anschließend 200 µl in die Vertiefung einer 96-Kavitäten-Mikrotiterplatte pipettiert und nach kurzem Vortexen 10 min bei 4 °C und 1.200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Die weitere Bearbeitung erfolgte auf Eis.

Je nach Fragestellung wurden unterschiedliche Kombinationen fluorochromgekoppelter Antikörper bzw. MHC-Klasse-I-Tetramere für die Färbungen benutzt, wobei die einzelnen Antikörper- bzw. Tetramer-Fluorochrom-Konjugate sowie der Fc-Blocker in FACS-Puffer in der jeweils nebenstehenden Endkonzentration eingesetzt wurden:

anti-Maus-CD4-APC	1:100 Endkonzentration
anti-Maus-CD8-FITC	1:100 Endkonzentration
anti-Maus-CD8-PE	1:100 Endkonzentration
anti-Maus-CD11a-PE	1:500 Endkonzentration
anti-CD27-PE	1:100 Endkonzentration
anti-Maus-CD62L-PE	1:100 Endkonzentration
anti-Maus-CD127-PE	1:100 Endkonzentration
anti-Maus-IFN- γ -APC	1:100 Endkonzentration
anti-Maus-IL-2-PE	1:100 Endkonzentration
anti-Maus-KLRG1-PE	1:200 Endkonzentration
anti-Maus-TNF- α -PE	1:100 Endkonzentration
IgG-Isotyp-Kontrolle-PE	1:100 Endkonzentration
IgG-2a-Isotyp-Kontrolle-PE	1:100 Endkonzentration
SIINFEKL-H-2K ^b -Tetramer-APC	1:200 Endkonzentration
anti-Maus-CD16/CD32 als Fc-Blocker	1:100 Endkonzentration

Jedes Zellpellet wurde in insgesamt 100 µl Färbeansatz resuspendiert. Bei Einsatz von Tetramer wurden die Zellpellets zunächst in einem Teilansatz von 50 µl mit dem mit Fluorochrom konjugierten Tetramer sowie Fc-Blocker je Kavität resuspendiert. Nach 45 min Einwirkzeit (ohne Lichteinwirkung, bei 4 °C) wurden die weiteren Antikörper-Fluorochrom-Konjugate in zusätzlichen 50 µl Färbeansatz hinzugegeben. Bei Färbung ohne Tetramer enthielt der vorab gegebene Teilansatz nur den Fc-Blocker bei einer Einwirkzeit von 20 min.

Zusätzlich wurde für die durch Verwendung mehrerer Fluorochrome erforderliche Kompensationsberechnung der FACS-Analyse aus allen Einzelproben ein Zellgemisch hergestellt, von dem für jeden Probendurchgang ein ungefärbter Ansatz und für jedes in der Färbung verwendete Fluorochrom ein nur mit diesem gefärbter Ansatz hergestellt wurde. Die Endkonzentrationen der in diesen Kompensationsfärbungen verwendeten Antikörper-Fluorochrom-Konjugate (anti-CD8-FITC, anti-CD8-PE, anti-CD4-APC) waren die gleichen wie oben genannt.

Das Endvolumen von 100 µl Färbeansatz blieb 30 min auf den Zellen (ohne Lichteinwirkung, bei 4 °C). Anschließend wurden die Färbeansätze in der 96-Kavitäten-Mikrotiterplatte nach kurzem Vortexen 10 min bei 4 °C und 1.200 U/min zentrifugiert, danach der Überstand verworfen. Die nicht gebundenen Antikörper- und Tetramer-Fluorochrom-Konjugate wurden durch zweimaliges Resuspendieren in FACS-Puffer, anschließendes Zentrifugieren (10 min, 4 °C, 1.200 U/min) und Verwerfen des Überstandes ausgewaschen. Für die Analyse mit dem Fluoreszenzdurchflußzytometer wurden die angefärbten Zellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Diese weitere Bearbeitung und Lagerung erfolgte unter möglichst wenig Lichteinwirkung und auf Eis.

2.3.1.2 Leukozyten aus der Milz

Die den Mäusen unmittelbar nach Tötung entnommenen Milzen wurden jeweils in ca. 3 ml RPMI-Medium + 10 % FCS in einem 15 ml-Röhrchen aufgenommen und anschließend auf Eis gelagert und transportiert. Aus den Milzen wurden jeweils Einzelzelllysate hergestellt, indem die Milzen durch ein 40 µm-Zellsieb in die Kavitäten von 6-Kavitäten-Mikrotiterplatten gedrückt wurden, wodurch aus jeder Milz ca. 2,5 ml Zellsuspension entstanden, die in 15 ml-Röhrchen überführt wurden. Die weitere Behandlung der Proben (Erythrozytenlyse und Vorlegen der

Leukozytenpellets in 96-Kavitäten-Mikrotiterplatten) erfolgte in gleicher Weise wie für die Blutproben, siehe Abschnitt 2.3.1.1, wobei wegen der höheren Zellzahl aus dem Zellysate einer Milz fünf Kavitäten mit Zellsuspension für die verschiedenen Stimulations- und Färbeansätze befüllt wurden.

2.3.1.2.1 Färbung mittels Oberflächenantikörpern

Für die Bestimmung des Anteils SIINFEKL-spezifischer und des Anteils aktivierter (CD11a-hochpositiver) CD8⁺-T-Zellen wurde je Tier eine Kavität mit Milzleukozyten mit einem Ansatz aus anti-CD8-FITC, anti-CD11a-PE und SIINFEKL-H-2K^b-Tetramer-APC sowie Fc-Blocker, wie für Blutleukozyten beschrieben, gefärbt und für die durchflußzytometrische Analyse aufbereitet.

2.3.1.2.2 Färbung auf Funktionsmarker mit In-vitro-Stimulation

Für die Überprüfung der Funktionalität der antigenspezifischen Milzleukozyten anhand bestimmter Funktionsmarker in vitro wurden von Zellsuspensionen aus jeder Milz entsprechend der Zahl der erforderlichen Färbeansätze jeweils drei Kavitäten mit SIINFEKL-Peptid stimuliert. Dazu wurden je Kavität 100 µl SIINFEKL-GolgiPlugTM-Stimulationslösung vorgelegt und 100 µl Milzleukozytensuspension hinzupipettiert. Je Probe wurde eine Kavität mit 100 µl Milzleukozytensuspension als Negativkontrolle nicht stimuliert, sondern mit GolgiPlugTM-Lösung ohne SIINFEKL-Peptid angesetzt, sonst aber der gleichen Behandlung unterzogen. Alle Ansätze wurden 6 h bei 37 °C im Zellkulturschrank inkubiert, anschließend 10 min bei 4 °C und 1.200 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde zu allen Proben jeweils 50 µl Fc-Blocker-Lösung (Fc-Blocker 1:100 in FACS-Puffer gelöst) hinzugegeben, nach 15 min Einwirkdauer jeweils 50 µl Färbeansatz mit anti-CD8-FITC für die Oberflächenfärbung. Nach weiteren 30 min Einwirkzeit, Zentrifugation (10 min bei 4 °C und 1.200 U/min) und Verwerfen des Überstandes wurden die Zellpellets in jeder Kavität mit 100 µl Zellfixierungs-Zellpermeabilisierungslösung (Cytofix/CytopermTM, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) resuspendiert. Nach 15 min Einwirkzeit auf Eis wurde in jede Kavität 100 µl Permeabilisierungs-Waschpuffer (Perm/WashTM, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) hinzugegeben, nach vorsichtigem Mischen mittels Vortexen erfolgten Zentrifugation (10 min bei 4 °C und 1.200 U/min) und anschließendes Verwerfen des Überstandes.

Es wurden in Permeabilisierungs-Waschpuffer drei verschiedene Färbeansätze für

die intrazelluläre Färbung angesetzt (anti-IFN- γ -APC und anti-IL-2-PE; anti-IFN- γ -APC und anti-TNF- α -PE; anti-IFN- γ -APC und IgG-2a-PE; verwendete Konzentrationen s. o.), von denen je 100 μ l je Kavität und Probe für die Resuspension der mit SIINFEKL stimulierten Zellen verwendet wurde. Je Kavität der nicht mit SIINFEKL stimulierten Zellen wurden 100 μ l Färbeansatz mit anti-IFN- γ -APC hinzugegeben. Nach 30 min Einwirkdauer auf Eis und ohne Lichteinwirkung wurden die Kavitäten mit je 100 μ l Permeabilisierungs-Waschpuffer aufgefüllt und nach Vortexen zentrifugiert (10 min bei 4 °C und 1.200 U/min). Nach Verwerfen des Überstandes und Resuspendierung der Pellets in 100 μ l Permeabilisierungs-Waschpuffer je Kavität und erneuter Zentrifugation (10 min bei 4 °C und 1.200 U/min) wurden die Zellpellets in jeweils 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt.

2.3.2 Probenanalyse mittels Fluoreszenzdurchflußzytometrie

Die Detektion und Sortierung der fluorochromgefärbten Blut- und Milzleukozyten erfolgte mittels Fluoreszenzdurchflußzytometrie (FACS). Hierzu wurden ein Gerät des Modells BD FACS CantoTM II (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) und das Programm BD FACS DivaTM, Version 6.1.3 (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg), verwendet.

Zunächst wurden für jeden Probendurchgang die für die Kompensationsberechnung erforderlichen Zellsuspensionen (ungefärbt und mit allen für den Färbeansatz des Probendurchgangs verwendeten Fluorochromen jeweils einzeln gefärbt) aufgenommen. Auf dieser Grundlage wurden die Kompensationseinstellungen getroffen. Von jeder zu untersuchenden Einzeltierprobe oder gruppenweisen Sammelprobe wurden die Werte für die Vorwärtsstreuung (engl. *foreward scatter*, FSC) und Seitwärtsstreuung (engl. *sideward scatter*, SSC) linear aufgenommen, die gemessene Intensität der in dem jeweiligen Färbeansatz eingesetzten Fluorochrome logarithmisch über fünf log₁₀-Stufen. Die auf diese Weise generierten fcs-Dateien wurden in der weiteren Auswertung mit dem Programm FlowJo der Version 7.6.5 (Fa. Tree Star, Ashland, OR, USA) bearbeitet.

2.3.3 Auswertung der durchflußzytometrisch gewonnenen Daten

Exemplarisch für die Probenanalyse mit Hilfe des Programms FlowJo ist im folgenden die Auswertung einer Probe, die mit anti-CD8-FITC, anti-CD11a-PE

und SIINFEKL-H-2K^b-Tetramer-APC gefärbt wurde, dargestellt.

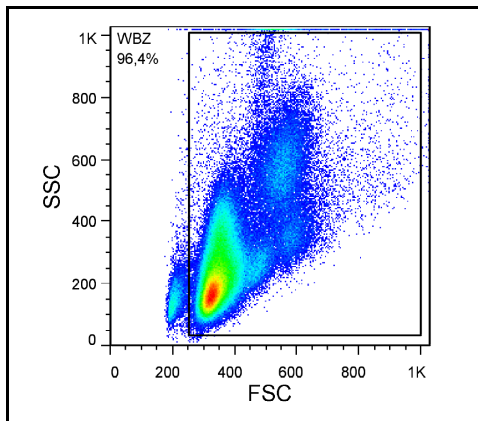


Abbildung 2: Beispiel für die Analyse der mittels FACS gewonnenen Daten einer Blutprobe mit dem Programm FlowJo, hier Definition einer Leukozytenpopulation.

Aus der Darstellung zunächst aller in linearer FSC/SSC-Punktauftragung über einem Grenzwert auf der x-Achse (FSC) aufgenommenen Ereignisse wurden diejenigen von der weiteren Auswertung ausgeschlossen, bei denen es sich nach der Größe und Granularität vermutlich nicht um Leukozyten handelt. Die anderen Ereignisse (im hier gezeigten Beispiel 96,4 % der dargestellten, vom Rechteck umfaßt) wurden als Leukozytenpopulation angesehen und die weitere Analyse von Oberflächenmarkern und Berechnung der Anteile bestimmter (Unter-)Populationen anhand gemessener Fluoreszenzintensitäten auf sie bezogen.

Um z. B. den Anteil SIINFEKL-Peptid-antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen sowie den der insgesamt aktivierten CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Leukozyten ermitteln zu können, waren die Zellen mit einem Ansatz aus anti-CD8-FITC und SIINFEKL-Tetramer-APC sowie anti-CD11a-PE gefärbt worden.

Um für einen und/oder mehrere Marker positive Zellpopulationen erkennen und deren Anteile an der Leukozytenpopulation ermitteln zu können, wurden die Ereignisse der definierten Leukozytenpopulation („WBZ“) der Probe in einer Punktauftragung dargestellt, wobei die Achsen jeweils für ein Fluorochrom in logarithmischer Skalierung die gemessenen Intensitäten der Ereignisse zeigen.

In der hier beispielhaft gezeigten Färbung kann dies durch Auftragung von FITC- gegen APC-Intensität einerseits und FITC- gegen PE-Intensität andererseits erfolgen.

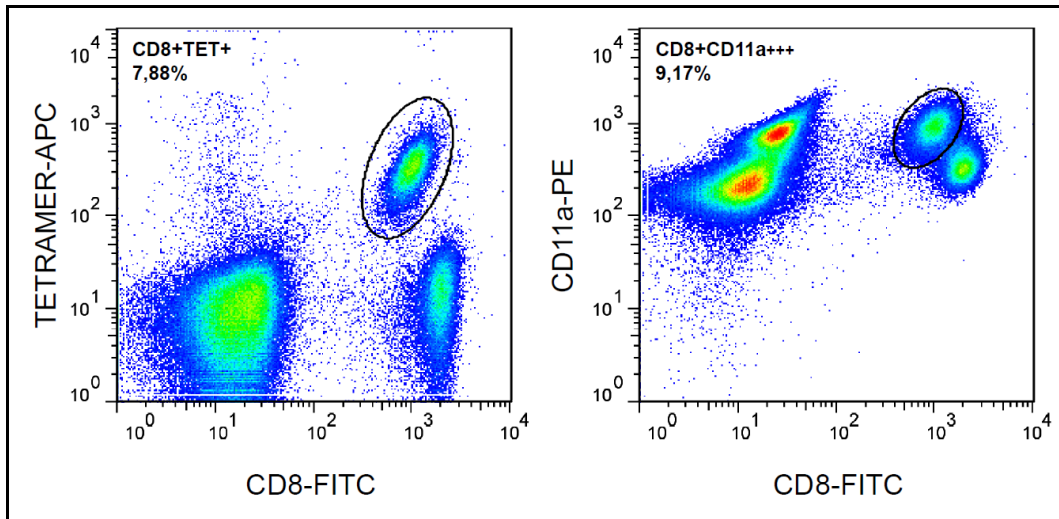


Abbildung 3: Beispiel für die Analyse der mittels FACS gewonnenen Daten einer Blutprobe mit dem Programm FlowJo, hier Definition der Population der SIINFEKL-spezifischen $CD8^+$ -T-Zellen (links) sowie der aktivierten $CD8^+$ -T-Zellen (rechts) aus der Population aller WBZ.

Mittels Definition einer Teilmenge der dargestellten Ereignisse als der zu bestimmenden Population (hier durch ovale Eingrenzung einer erkennbaren, von anderen abgrenzbaren Zellpopulation) kann deren zahlenmäßiger Anteil an der Gesamtzahl der Ereignisse errechnet werden. Im dargestellten Beispiel ist dies der Anteil der SIINFEKL-spezifischen bzw. der CD11a-hochpositiven $CD8^+$ -T-Zellen.

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 3.02 (Fa. GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

III ERGEBNISSE

Grundsätzlich wurde zur Auswertung aller nachfolgend dargestellten Vakzinierungsversuche die Immunantwort in Blutproben, teilweise auch in Milzzellysat, anhand bestimmter Marker in der Leukozytenfraktion bestimmt. Dazu wurden die Proben mit fluorochromgekoppelten Antikörpern und MHC-Klasse-I-Tetrameren gefärbt und mittels Durchflußzytometrie ausgewertet.

Standardmäßig wurden in den Proben sowohl die antigenspezifische CD8⁺-T-Zell-Immunantwort gegen das Modellantigen Ovalbumin wie auch die Gesamt-CD8⁺-T-Zell-Immunantwort bestimmt. Hierzu wurde ein Färbeansatz mit anti-CD8-FITC, anti-CD11a-PE und SIINFEKL-Tetramer-APC verwendet (vgl. Kapitel II). Durch Verwendung von anti-CD8-FITC wurde diejenige Gruppe Lymphozyten identifiziert, die die im Rahmen dieser Arbeit interessierende und auf die genannten Protokolle zu erwartende zytotoxische zelluläre Immunantwort trägt. Mit SIINFEKL-Tetramer-APC erfolgte die Identifizierung derjenigen CD8⁺-T-Zellen, die Spezifität für das im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Modellantigen, das Hühnereiweiß Ovalbumin, aufwiesen. Zusätzlich wurde durch die Bestimmung des Anteils der CD8⁺-T-Zellen, die auf ihrer Oberfläche CD11a hoch exprimierten (CD11a⁺⁺⁺), die Höhe der Gesamt-CD8⁺-T-Zell-Immunantwort bestimmt. Bei der hierbei erfaßten Population handelt es sich um diejenigen CD8⁺-T-Zellen, die spezifischen Antigenkontakt hatten, also keine naiven T-Zellen, sondern determinierte T-Effektorzellen oder T-Gedächtniszellen sind (vgl. Rai et al., 2009). Weil der Marker CD11a nicht antigenspezifisch ist, kann er zur Überprüfung für eine T-Zell-immunogene Pathogeninjektion (hier LM-OVA) verwendet werden, zugleich als Plausibilitätskontrolle für den gemessenen Wert der gegen das SIINFEKL-Epitop gerichteten CD8⁺-T-Zell-Population.

Die nachfolgenden Angaben über SIINFEKL-spezifische und Gesamt-CD8⁺-T-Zell-Immunantwort beziehen sich auf die gemessenen Anteile FITC-positiver und zugleich APC-positiver bzw. zugleich PE-hochpositiver Zellpopulationen an der Leukozytenfraktion insgesamt (vgl. II.2.3) Letztere ist als Bezugsgröße besonders geeignet, weil sie, anders als der Anteil von CD8⁺-T-Zellen im Blut (Zinkernagel, 1996), zahlenmäßig vergleichsweise konstant ist.

Soweit nicht anders angegeben, wurden bei jeder Antigeninjektion mittels PLGA-

Mikrosphären je Tier 1 mg PLGA-MS eines durchschnittlichen Durchmessers von 2,0 µm und 100 µg SIINFEKL-Peptid eingesetzt. Bei Applikation von LM-OVA wurden jedem Tier 5×10^6 Bakterien eines attenuierten OVA-exprimierenden Stammes von *Listeria monocytogenes* injiziert. Genauere Beschreibungen siehe in Kapitel II.

1 Festlegung eines geeigneten Vakzinierungsschemas mit Kurzzeit-Intervall-Boosting und PLGA-Mikrosphären

In diesem Versuch wurde in vivo untersucht, mit welchem Protokoll sich mit einem Kurzzeit-Intervall-Boosting bei zwei Antigeninjektionen im Abstand von 7 Tagen möglichst starke spezifische T-Zell-Immunantworten hervorrufen lassen. Dabei kam Antigenapplikation mittels PLGA-Mikrosphären einerseits und mittels eines Pathogenvektors (LM-OVA) andererseits zum Einsatz. Mit dem Ziel einer möglichst guten Nutzung des Boosting-Effekts war zu klären, ob sich ein homologes oder ein heterologes Boosting besser eignen würde und ggf. in welcher Reihenfolge die unterschiedlichen Applikationen vorgenommen werden müssen.

Hierzu wurden sechs Gruppen gebildet, von denen die Gruppen 1-5 am ersten Tag des Versuchs (Tag -7) die erste Antigeninjektion (Injektion 1) erhielten, 7 Tage später (Tag 0) eine zweite (Injektion 2). Die Tiere der Gruppe 6 erhielten lediglich eine Antigeninjektion an Tag 0.

Applikationsreihenfolge und -art des Modellantigens Ovalbumin		
	Tag -7: Injektion 1	Tag 0: Injektion 2
Gruppe 1	attenuierte LM-OVA	attenuierte LM-OVA
Gruppe 2	attenuierte LM-OVA	PLGA-MS-SIINFEKL
Gruppe 3	PLGA-MS-SIINFEKL	PLGA-MS-SIINFEKL
Gruppe 4	PLGA-MS-SIINFEKL	attenuierte LM-OVA
Gruppe 5	PLGA-MS	attenuierte LM-OVA
Gruppe 6	-----	PLGA-MS-SIINFEKL

Tabelle 1: Grundlagen für ein Kurzzeit-Boosting: Behandlungsschema

Bestimmungen der Immunantwort erfolgten durch Auswertung von Blutproben am Tag vor Injektion 2 sowie 7, 13 und 42 Tage danach (Tag -1, 7, 13 und 42).

1.1 Stärke der spezifischen CD8⁺-T-Zell-Immunantwort

Zur Bestimmung der Stärke der spezifischen Immunantwort gegen das Modellantigen Ovalbumin wurde der Anteil antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten bestimmt.

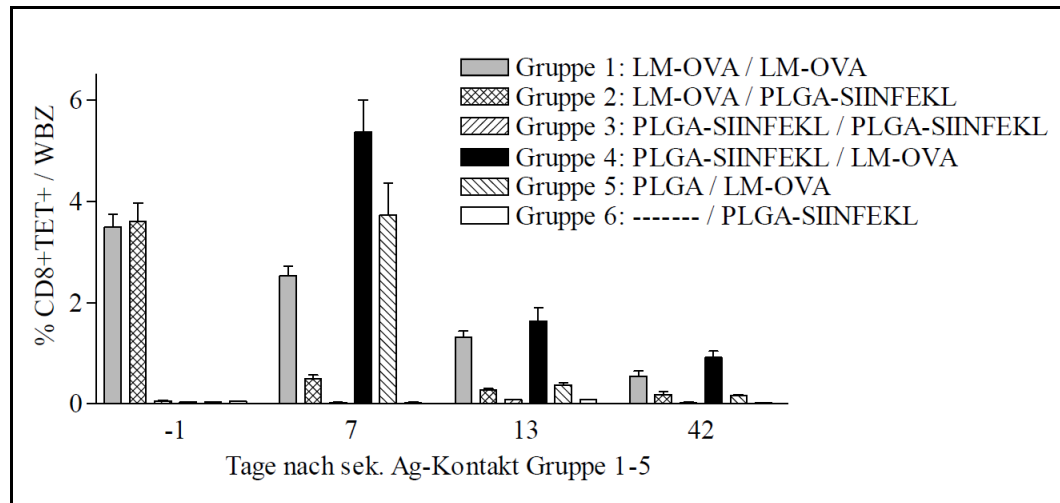


Abbildung 4: Grundlagen für ein Kurzzeit-Boosting: Spezifische CD8⁺-T-Zell-Immunantwort. Dargestellt ist der Anteil SIINFEKL-spezifischer CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten in % (MW ± SEM; alle Gruppen: n = 5) zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 = sekundärer Antigenkontakt bei Gruppen 1-5 = primärer Antigenkontakt bei Gruppe 6).

An Tag -1, dem Bestimmungszeitpunkt für die primäre T-Zell-Immunantwort, waren eindeutig abgrenzbare und sich vom Wert der unbehandelten Kontrollgruppe abhebende antigenspezifische CD8⁺-T-Zell-Populationen nur in den Gruppen 1 und 2, also bei den Tieren, die eine Injektion mit OVA-exprimierenden Listerien erhalten hatten, nicht aber in den Gruppen, die mit SIINFEKL-Peptid beladene oder unbeladene PLGA-Mikrosphären erhalten hatten, vorhanden.

Der Anteil antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen war an Tag 7 (Effektorphase nach sekundärer Stimulation) in Gruppe 4 am höchsten ($5,37 \pm 0,634 \%$), gefolgt von den Gruppen 5, 1 und 2. Die Gruppen 3 und 6, die keine LM-OVA erhalten hatten, wiesen die geringsten Werte auf.

An Tag 13 und Tag 42 (in der Kontraktions- bzw. Gedächtnisphase) zeigte jeweils Gruppe 4 den höchsten Wert, gefolgt von Gruppe 1.

1.2 Stärke der gesamten CD8⁺-T-Zell-Immunantwort

Zur Untersuchung der Stärke der Gesamt-T-Zell-Immunantwort wurde mittels CD11a der Anteil aktivierter CD8⁺-T-Zellen (CD11a⁺⁺⁺) bestimmt.

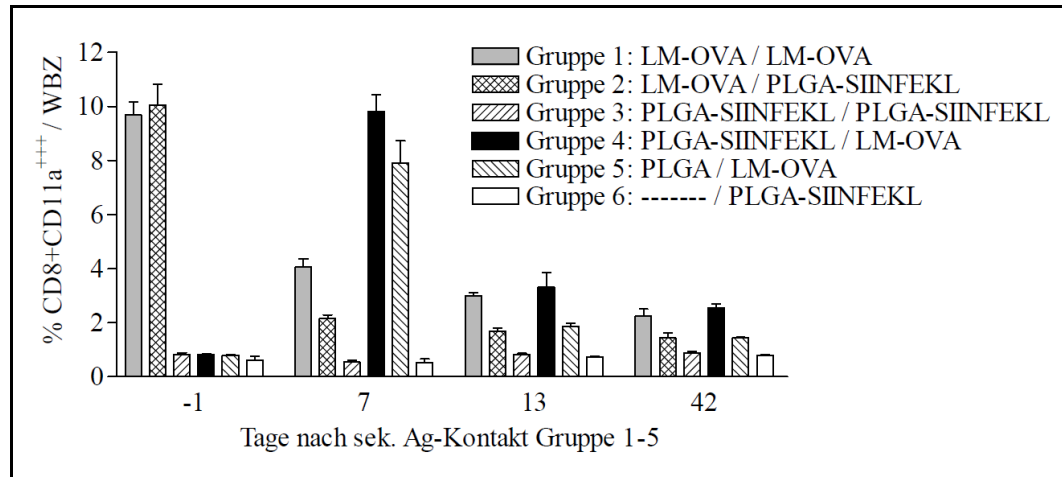


Abbildung 5: Grundlagen für ein Kurzzeit-Boosting: Gesamt-CD8⁺-T-Zell-Immunantwort. Dargestellt ist der Anteil CD11a-hochpositiver CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten in % (MW ± SEM; alle Gruppen: n = 5) zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 = sekundärer Antigenkontakt bei Gruppen 1-5 = primärer Antigenkontakt bei Gruppe 6).

Es zeigte sich zu allen Bestimmungszeitpunkten, daß die gemessenen Anteile CD8⁺CD11a⁺⁺⁺-T-Zellen in den Gruppen, die vor der Messung LM-OVA erhalten hatten (Gruppen 1, 2, 4 und 5), höher war als in den Gruppen 3 und 6, die keine LM-OVA erhalten hatten.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Entscheidung getroffen, für weitere Versuche ein heterologes Boosting mit PLGA-basiertem Priming sowie LM als OVA-exprimierendem Vektor für die sekundäre Antigenverabreichung genauer zu untersuchen.

2 Einfluß der Antigenmenge im Priming auf Stärke und Typ einer sekundären Immunantwort durch Boosting

Ziel des Versuchs war herauszufinden, ob es bei der Beladung der PLGA-Mikrosphären für die primäre Antigeninjektion einer Mindestmenge Antigen bedarf, damit durch sekundären Antigenkontakt mit spezifischem Pathogen (LM-OVA) eine möglichst starke CD8⁺-T-Zell-Immunantwort hervorgerufen werden kann.

Dazu wurden Gruppen gebildet, die die gleiche Menge PLGA-Mikrosphären (1 mg je Tier) erhielten, für deren Beladung aber unterschiedliche Mengen SIINFEKL-Peptid (100 µg, 10 µg, 1 µg bzw. 0,1 µg je Tier) verwendet wurden. Als Negativkontrolle diente eine weitere Gruppe, die keine Injektion an Tag -7 erhielt, also lediglich eine primäre Immunantwort würde entwickeln können. Alle Gruppen erhielten 7 Tage später (Tag 0) eine Injektion mit der gleichen Menge LM-OVA.

Bestimmungen der Immunantwort erfolgten durch Auswertung von Blutproben an den Tagen 7, 13 und 40 nach Injektion von LM-OVA.

2.1 Stärke der spezifischen CD8⁺-T-Zell-Immunantwort

Zur Bestimmung der Stärke der spezifischen Immunantwort gegen das Modellantigen Ovalbumin wurde der Anteil antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten bestimmt.

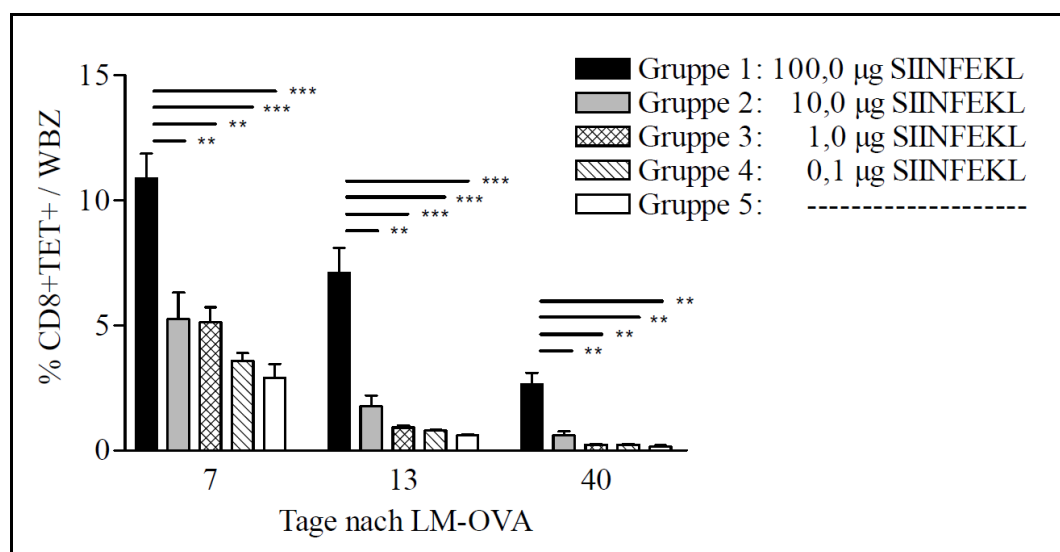


Abbildung 6: Titration der Priming-Antigenmenge: Spezifische CD8⁺-T-Zell-Immunantwort. Dargestellt ist der Anteil SIINFEKL-spezifischer CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten in % (MW ± SEM; alle Gruppen: n = 4) zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 = LM-OVA-Injektion); statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben (* = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,01; *** = p ≤ 0,001).

Es zeigte sich, daß innerhalb aller Gruppen an Tag 7 nach LM-OVA-Injektion die größte antigenspezifische CD8⁺-T-Zell-Population vorhanden war. Diese war in allen Gruppen an Tag 13 und nochmals an Tag 40 geringer. Der Anteil antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen war jeweils in Gruppe 1 (100 µg Antigen) am

höchsten (maximaler Wert an Tag 7: $10,90 \pm 0,991$ %), am geringsten in Gruppe 5 (Negativkontrolle; niedrigster Wert an Tag 40: $0,16 \pm 0,056$ %).

2.2 Stärke der gesamten $CD8^+$ -T-Zell-Immunantwort

Zur Untersuchung der Stärke der Gesamt-T-Zell-Immunantwort wurde mittels CD11a der Anteil aktivierter $CD8^+$ -T-Zellen ($CD11a^{+++}$) bestimmt.

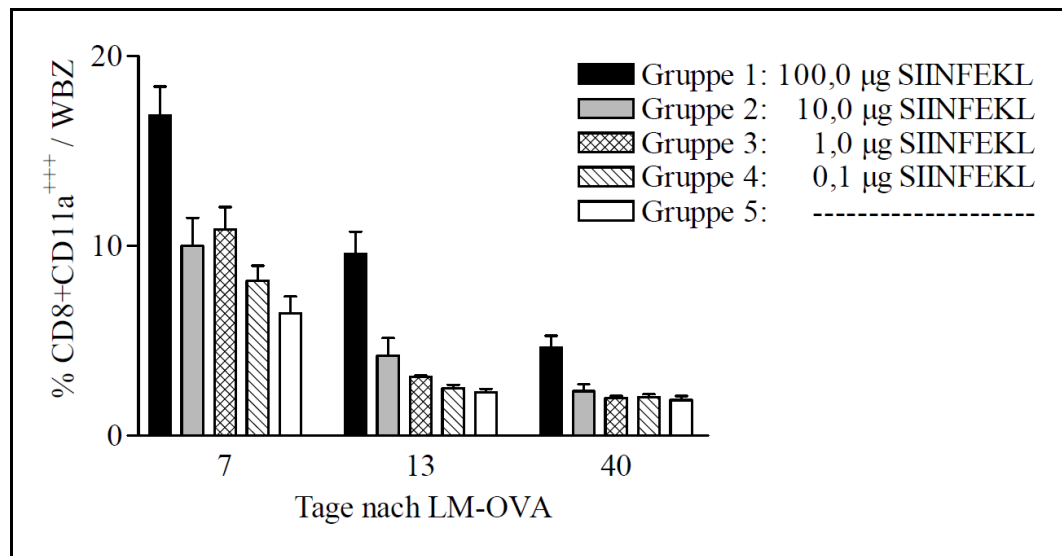


Abbildung 7: Titration der Priming-Antigenmenge: Gesamt- $CD8^+$ -T-Zell-Immunantwort. Dargestellt ist der Anteil $CD11a$ -hochpositiver $CD8^+$ -T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten in % (MW \pm SEM; alle Gruppen: n = 4) zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 = LM-OVA-Injektion).

Es zeigte sich in allen Gruppen, daß der Anteil der $CD8^+CD11a^{+++}$ -T-Zellen an der Gesamtzahl der Leukozyten an Tag 7 am höchsten und an Tag 40 am geringsten war. Zu allen Bestimmungszeitpunkten war die Gesamt- $CD8^+$ -T-Zell-Immunantwort in Gruppe 1 am höchsten, am geringsten in Gruppe 5.

2.3 Charakterisierung der spezifischen $CD8^+$ -T-Zell-Population

Zur genaueren Charakterisierung der antigenspezifischen $CD8^+$ -T-Zell-Immunantwort wurde diese Population auf ihren Phänotyp untersucht. Hierzu wurde jeweils die Expression der Oberflächenmarker CD27, CD62L, CD127 und KLRG1 ermittelt.

CD27 ist ein costimulatorisches Molekül, das CD70 bindet. Es wird bereits auf naiven $CD8^+$ -T-Zellen exprimiert und auf fröhendifferenzierten T-Zellen hochreguliert, weswegen seine hohe Expression ($CD27^{+++}$) als Aktivierungsmarker genutzt werden kann. Er wird geringer exprimiert, wenn die

T-Zelle zur Gedächtniszelle wird (Hintzen et al., 1993). Ebenso spielt CD27 für die Unterscheidung verschiedener Subpopulationen von T-Gedächtniszellen eine Rolle (Hikono et al., 2007) und wird auf CD8⁺-T-Gedächtniszellen nach sekundären und weiteren Antigenstimulationen zunehmend geringer exprimiert als nach einer primären Stimulation (Wirth et al., 2010b).

Das Selektin CD62L ist ein Marker für naive CD8⁺-T-Zellen, der nach deren Aktivierung in der Effektorphase herunterreguliert wird (Yang et al., 2011). Als Leukozytenadhäsionsmolekül vermittelt CD62L das Entlangrollen der T-Zellen am Endothel von Blutgefäßen und ist damit wichtig für deren Migrationsvermögen. Das mit dem Zytokinrezeptor CCR7 coexprimierte CD62L wird auf verschiedenen Subpopulationen von T-Gedächtniszellen in unterschiedlichem Maße exprimiert (Sallusto et al., 1999) und ist daher Marker für die Unterscheidung von Effektor-T-Gedächtniszellen (engl. *effector memory T-cells*; TEM) und zentralen T-Gedächtniszellen (engl. *central memory T-cells*; TCM), wobei TCM CD62L in höherem Maße exprimieren als TEM. Insofern sich unter sekundären T-Gedächtniszellen ein relativ niedrigerer Anteil TCM findet als bei primären (Wirth et al., 2010b), kann CD62L auch zur Unterscheidung von primärer und sekundärer T-Gedächtniszellpopulation genutzt werden.

CD127, die α -Kette des IL-7-Rezeptors, fungiert als Marker langlebiger T-Gedächtniszellen (Huster et al., 2004). KLRG1-Expression wird als Marker für endgültig differenzierte T-Zellen, die ihre Proliferationsfähigkeit verloren haben, gesehen (Cush und Flaño, 2011) und ermöglicht die Unterscheidung kurzlebiger T-Effektorzellen von Vorläufern der T-Gedächtniszellen (Sarkar et al., 2008). Zudem ist, unabhängig davon, ob es sich um eine primäre oder eine sekundäre Immunreaktion handelt, damit zu rechnen, daß im Zusammenhang mit systemischer Inflammation bei Antigenkontakt auf T-Gedächtniszellen die Expression von CD127 eher geringer, die von KLRG1 eher höher ist (Wirth et al., 2011).

Die durchflußzytometrische Analyse für diese Marker wurde gruppenweise anhand von Sammelproben der jeweils vier Tiere einer Gruppe durchgeführt.

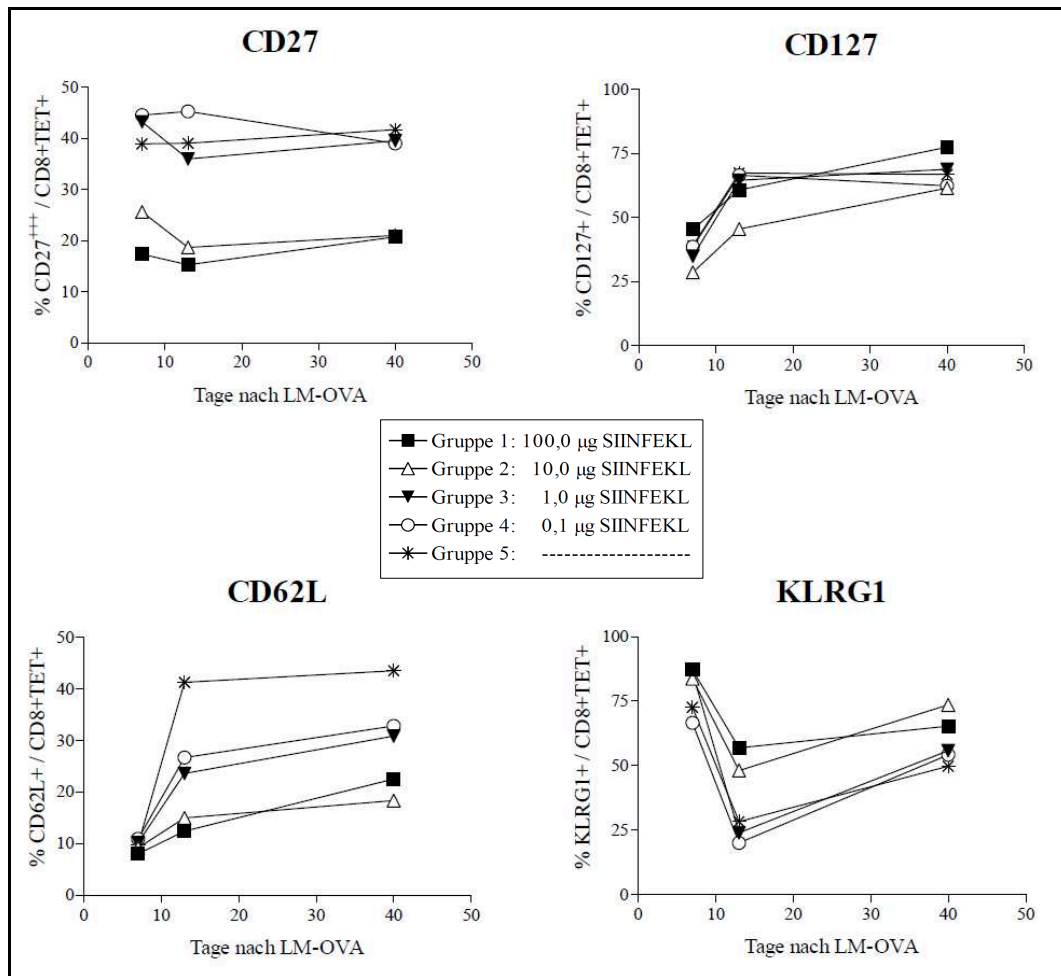


Abbildung 8: Titration der Priming-Antigenmenge: Phänotypisierung der spezifischen CD8⁺-T-Zell-Immunantwort anhand der Oberflächenmarker CD27, CD62L, CD127 und KLRG1. Dargestellt ist jeweils für die Sammelprobe einer Gruppe in % der Anteil der SIINFEKL-spezifischen CD8⁺-T-Zellen, die den Marker exprimieren (CD62L, CD127, KLRG1) bzw. hoch exprimieren (CD27).

Der Anteil der CD27-hochpositiven (CD27⁺⁺⁺) antigenspezifischen CD8⁺-T-Zellen war zu allen Bestimmungszeitpunkten in den Gruppen am geringsten, für deren PLGA-Mikrosphären zur Beladung die größten Mengen Antigen verwendet worden waren (Gruppen 1 und 2 mit 100 µg bzw. 10 µg SIINFEKL je Tier).

Der Anteil der CD62L-positiven antigenspezifischen CD8⁺-T-Zellen war in allen Gruppen an Tag 7 am geringsten und stieg an den Tagen 13 und 40 an. Dabei erfolgte der relative Anstieg in den Gruppen 3, 4 und 5 (geringe bzw. keine Antigenmenge an Tag -7) in stärkerem Maße als in den Gruppen 1 und 2.

Die Expression von CD127 auf den antigenspezifischen CD8⁺-T-Zellen war in allen Gruppen an Tag 13 höher als an Tag 7. In den Gruppen 1 und 2 stieg sie

auch an Tag 40 gegenüber Tag 13 noch weiter an.

Der Anteil KLRG1-positiver antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen fiel in allen Gruppen von Tag 7 auf Tag 13 ab und stieg zum Tag 40 wieder an, ohne jedoch den jeweiligen Wert von Tag 7 wieder zu erreichen. Insbesondere an den Tagen 13 und 40 zeigte sich die deutlich höchste Expression in den Gruppen 1 und 2.

Durch diese Analyse konnte auch phänotypisch gezeigt werden, daß es sich bei den nach zweimaliger Antigenapplikation erreichten Immunreaktionen tatsächlich um sekundäre Immunreaktionen und nicht um primäre Immunantworten auf die Gabe von LM-OVA handelt. Zugleich ergab sich, daß die Stärke des nichtinflammatorischen Primings (im Sinne höherer Antigenmenge) Einfluß auf den phänotypischen Charakter der CD8⁺-T-Zell-Immunantwort zu haben scheint.

3 PLGA-Mikrosphären als Träger primären Antigens im Vergleich zu dendritischen Zellen

Daß sich PLGA-Mikrosphären für die primäre Antigenapplikation in dem definierten heterologen Kurzzeit-Boosting-Ansatz mit LM-OVA eignen, konnte, wie oben dargestellt, gezeigt werden. Nicht bekannt war, wie die mit ihnen erzielte Stärke der T-Zell-Immunantwort verglichen mit dem Einsatz dendritischer Zellen (DC) bei ansonsten gleichem Vorgehen zu beurteilen ist.

Um dies in vivo festzustellen, wurden zwei Gruppen miteinander verglichen, von denen an Tag -7 die eine SIINFEKL-Peptid an PLGA-Mikrosphären gebunden, die andere an DC gekoppelt erhalten hatte. Beide Gruppen erhielten 7 Tage später (Tag 0) einen zweiten Antigenkontakt in Form von LM-OVA.

Bestimmungen der Immunantwort erfolgten durch Auswertung von Blutproben 2 Tage vor sowie 7, 14 und 40 Tage nach Injektion von LM-OVA (Tag -2, 7, 14 bzw. 40).

3.1 Stärke der spezifischen CD8⁺-T-Zell-Immunantwort

Zur Bestimmung der Stärke der spezifischen Immunantwort gegen das Modellantigen Ovalbumin wurde der Anteil antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten bestimmt.

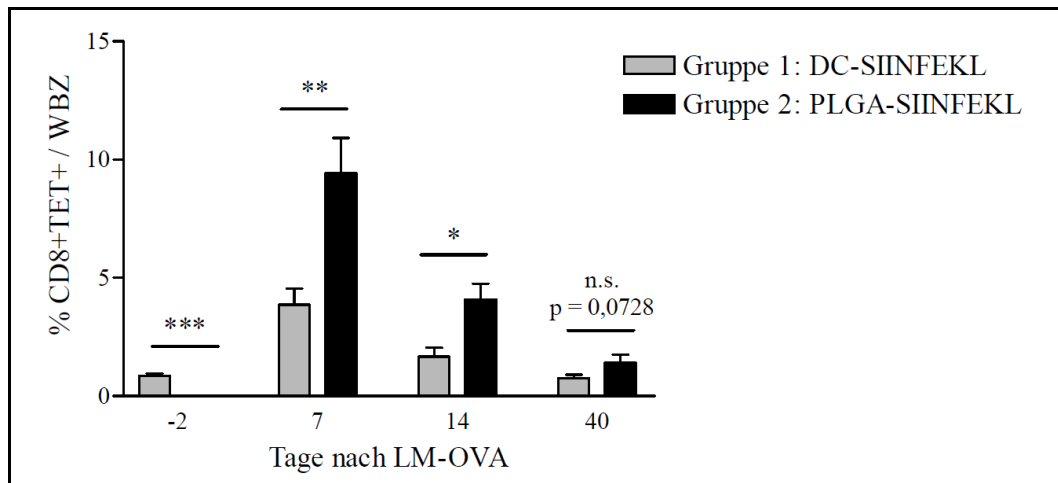


Abbildung 9: Vergleich PLGA-MS- mit DC-Priming. Spezifische CD8⁺-T-Zell-Immunantwort. Dargestellt ist der Anteil SIINFEKL-spezifischer CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten in % (MW \pm SEM; Gruppe 1: n = 5; Gruppe 2: n = 3) zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 = LM-OVA-Injektion); statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$).

An Tag -2, nach nur einmaligem Antigenkontakt und ohne Pathogeninjektion, war nur in Gruppe 1 eine spezifische CD8⁺-T-Zell-Population detektierbar. Zu allen Bestimmungszeitpunkten nach dem zweiten Antigenkontakt (Tag 7, 14 und 40) zeigte Gruppe 2 (SIINFEKL konjugiert an PLGA-Mikrosphären) den deutlich höheren Anteil antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten.

3.2 Stärke der gesamten CD8⁺-T-Zell-Immunantwort

Zur Untersuchung der Stärke der Gesamt-T-Zell-Immunantwort wurde mittels CD11a der Anteil aktivierter CD8⁺-T-Zellen (CD11a⁺⁺⁺) bestimmt.

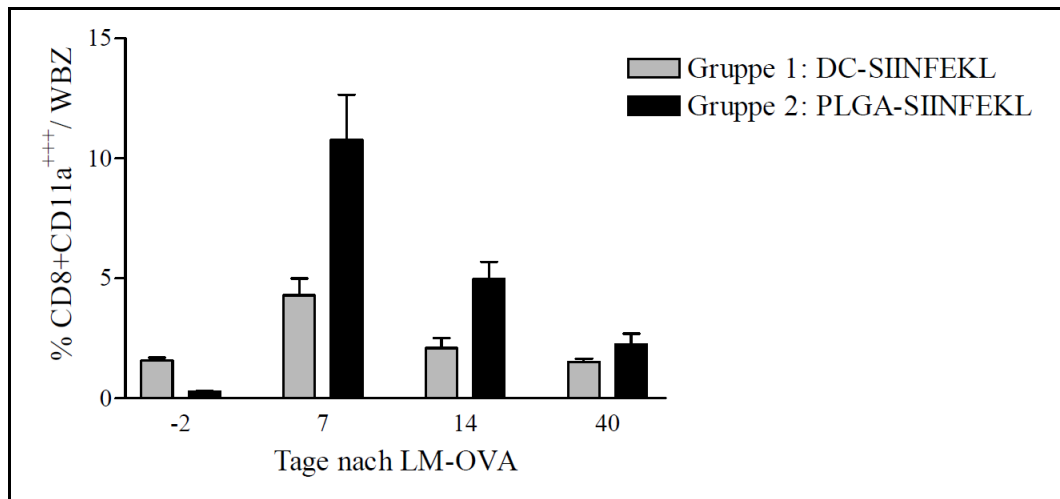


Abbildung 10: Vergleich PLGA-MS- mit DC-Priming. Gesamt-CD8⁺-T-Zell-Immunantwort. Dargestellt ist der Anteil CD11a-hochpositiver CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten in % (MW ± SEM; Gruppe 1: n = 5; Gruppe 2: n = 3) zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 = LM-OVA-Injektion).

An Tag -2, also vor der Verabreichung eines Pathogens, war der Anteil CD11a-hochpositiver CD8⁺-T-Zellen in beiden Gruppen recht gering, in Gruppe 1 aber deutlich größer als in Gruppe 2. Zu allen Bestimmungszeitpunkten nach dem zweiten Antigenkontakt (Tag 7, 14 und 40) zeigte dagegen Gruppe 2 (SIINFEKL konjugiert an PLGA-Mikrosphären) den deutlich höheren Anteil CD11a-hochpositiver CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten.

4 T-Zell-Immunogenität bei unterschiedlich langen Peptidantigenen an PLGA-Mikrosphären im Priming

Für den praktischen Einsatz von PLGA-Mikrosphären zur Antigenapplikation gegen verschiedene Erreger oder Tumoren wäre von Nutzen, daß eine wirksame primäre T-Zell-Aktivierung auch bei Verwendung unterschiedlicher Peptidantigene erfolgen kann.

Mit den nachfolgend dargestellten Versuchen wurde daher in vivo untersucht, in welcher Weise sich die Länge des für die Konjugation mit den PLGA-Mikrosphären verwendeten Peptidantigens auf die Stärke der CD8⁺-T-Zell-Immunantwort im Kurzzeit-Intervall-Boosting mit LM-OVA auswirkt.

4.1 Priming-Antigen: Vergleich von Gesamtprotein, 20mer und 8mer

Hierzu wurden unterschiedlich lange Peptide des Modellantigens Ovalbumin (OVA) verwendet, die jeweils mindestens das MHC-Klasse-I-Epitop mit der Sequenz SIINFEKL enthielten:

- Gesamtprotein (OVA) 385 Aminosäuren (Position 1-385)
- Eikosamer (20mer) von OVA 20 Aminosäuren (Position 251-270)
- Oktamer (8mer) von OVA 8 Aminosäuren (Position 257-264).

Es wurden vier Gruppen gebildet, von denen drei an Tag -7 PLGA-Mikrosphären mit Peptid (100 µg je Tier) erhielten, die vierte erhielt als Kontrollgruppe keine Injektion an Tag -7. Alle Gruppen erhielten 7 Tage später (Tag 0) LM-OVA.

Bestimmungen der Immunantwort erfolgten durch Auswertung von Blutproben 7, 13 und 40 Tage nach Injektion von LM-OVA (Tag 7, 13 und 40).

4.1.1 Stärke der spezifischen CD8⁺-T-Zell-Immunantwort

Zur Bestimmung der Stärke der spezifischen Immunantwort gegen das Modellantigen Ovalbumin wurde der Anteil antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten bestimmt.

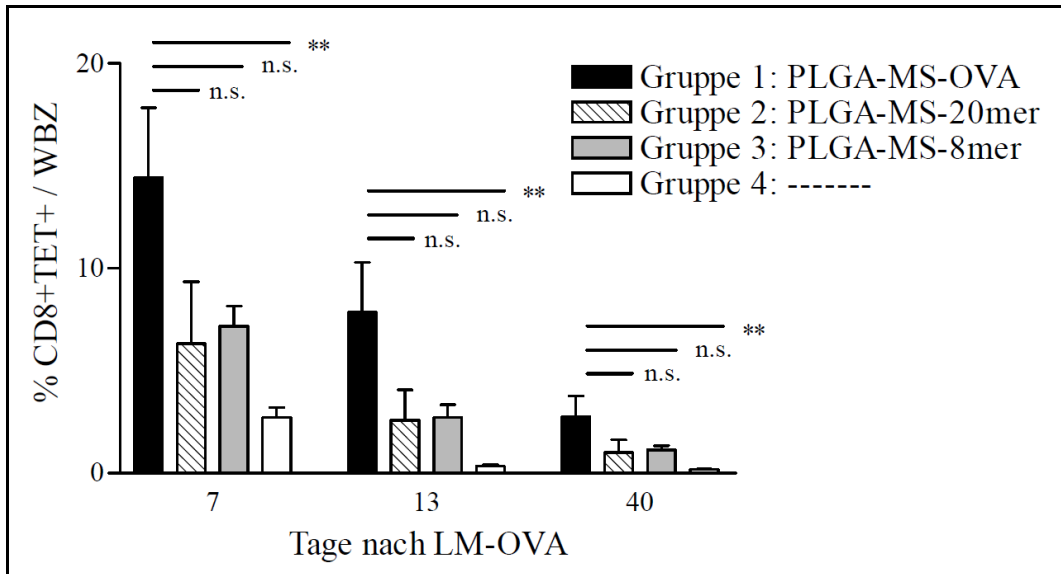


Abbildung 11: Verschiedene Peptidlängen (FLP, 20mer, 8mer): Spezifische CD8⁺-T-Zell-Immunantwort. Dargestellt ist der Anteil SIINFEKL-spezifischer CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten in % (MW \pm SEM; Gruppen 1, 2, 3: n = 4; Gruppe 4: n = 5) zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 = LM-OVA-Injektion); statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$).

Es zeigte sich, daß der Anteil der antigenspezifischen CD8⁺-T-Zellen zu allen Bestimmungszeitpunkten in der Gruppe, die OVA erhalten hatte, am höchsten war, während die Gruppen, die das 20mer bzw. das 8mer erhalten hatten, im Vergleich zueinander ähnlich hohe Werte aufwiesen. Allerdings waren die höheren Anteile SIINFEKL-spezifischer Zellen in der OVA-Gruppe nicht statistisch signifikant gegenüber der 20mer- und der 8mer-Gruppe.

4.1.2 Stärke der gesamten CD8⁺-T-Zell-Immunantwort

Zur Untersuchung der Stärke der Gesamt-T-Zell-Immunantwort wurde mittels CD11a der Anteil aktivierter CD8⁺-T-Zellen (CD11a⁺⁺⁺) bestimmt.

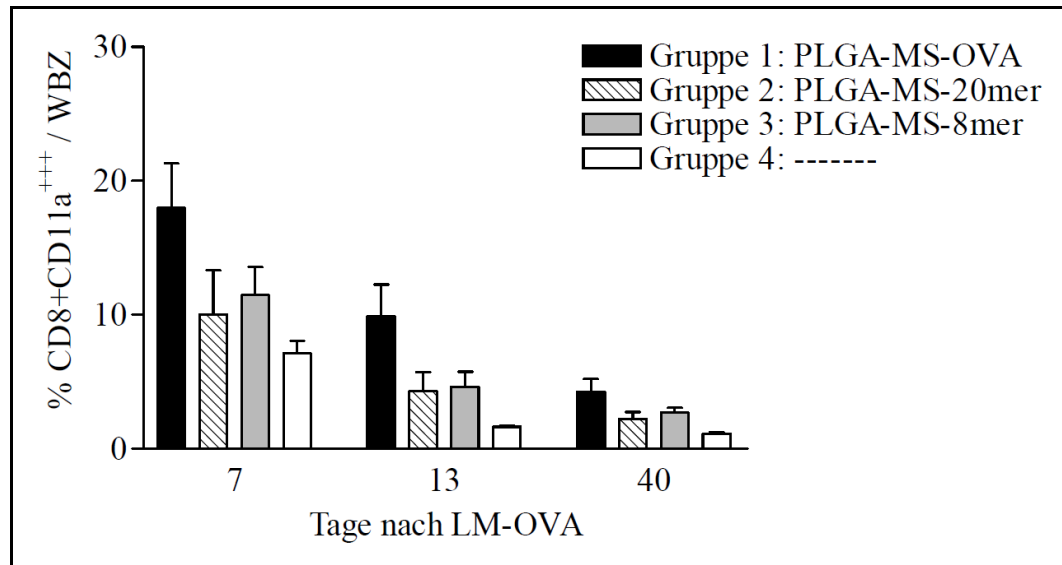


Abbildung 12: Verschiedene Peptidlängen (FLP, 20mer, 8mer): Gesamt-CD8⁺-T-Zell-Immunantwort. Dargestellt ist der Anteil CD11a-hochpositiver CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten in % (MW ± SEM; Gruppen 1, 2, 3: n = 4; Gruppe 4: n = 5) zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 = LM-OVA-Injektion).

Innerhalb aller Versuchsgruppen war die Gesamt-CD8⁺-T-Zell-Immunantwort jeweils an Tag 7 am höchsten und an Tag 40 am geringsten. Bezogen auf die einzelnen Bestimmungszeitpunkte zeigte jeweils die OVA-Gruppe den höchsten Wert, gefolgt von den Gruppen mit Oktamer und Eikosamer. Den jeweils geringsten Wert zeigte die Kontrollgruppe.

4.2 Priming-Antigen: Gesamtprotein im Vergleich mit MHC-I-Epitop

In einem weiteren Experiment wurden zwei Gruppen verglichen, von denen eine als primäre Antigeninjektion an Tag -7 mit Gesamtprotein (OVA), die andere mit dem MHC-Klasse-I-Epitop (SIINFEKL-Peptid, 8mer) beladene PLGA-Mikrosphären erhielt. Beiden Gruppen wurde 7 Tage später (Tag 0) LM-OVA injiziert. Eine Kontrollgruppe erhielt an Tag 0 LM-OVA, aber keine Injektion an Tag -7. Bestimmungen der Immunantwort erfolgten durch Auswertung von Blutproben 7, 14 und 42 Tage nach Injektion von LM-OVA (Tag 7, 14 bzw. 42).

4.2.1 Stärke der spezifischen CD8⁺-T-Zell-Immunantwort

Zur Bestimmung der Stärke der spezifischen Immunantwort gegen das Modellantigen Ovalbumin wurde der Anteil antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten bestimmt.

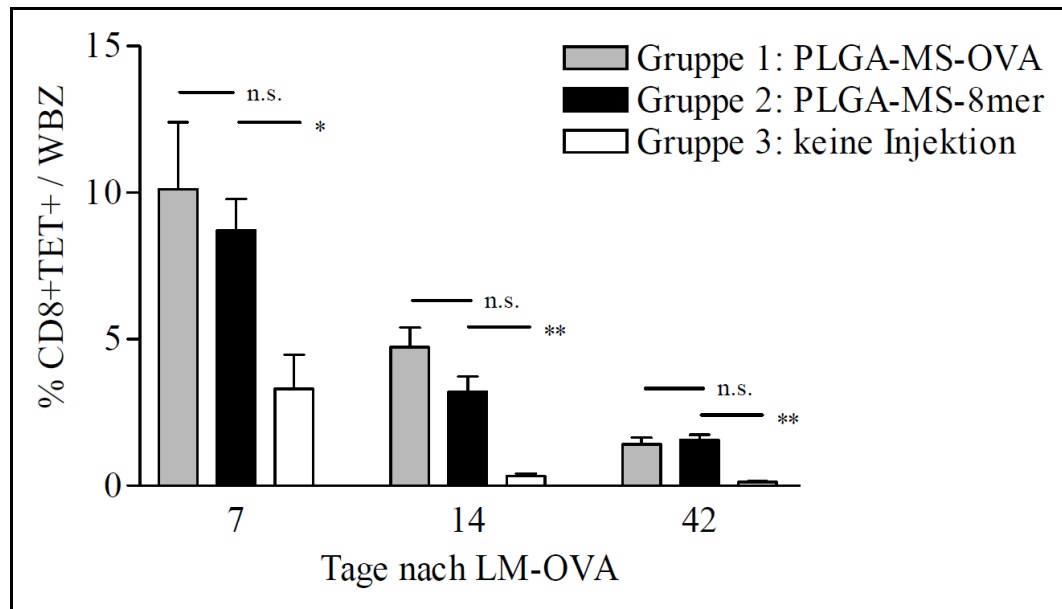


Abbildung 13: Gesamtprotein im Vergleich mit Oktamer: Spezifische CD8⁺-T-Zell-Immunantwort. Dargestellt ist der Anteil SIINFEKL-spezifischer CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten in % (MW ± SEM; Gruppen 1, 2: n = 4; Gruppe 3: n = 3) zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 = LM-OVA-Injektion); statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben (* = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,01; *** = p ≤ 0,001).

Insgesamt zeigten sich hinsichtlich der spezifischen CD8⁺-T-Zell-Antwort zwischen den beiden Vergleichsgruppen mit unterschiedlich langem Peptidantigen nur geringe Unterschiede, die zu keinem Bestimmungszeitpunkt statistisch relevant waren. Während an Tag 7 und Tag 14 die OVA-Gruppe den größeren Anteil antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen aufwies, war dieser Anteil an Tag 42 in der SIINFEKL-Gruppe geringgradig größer.

Innerhalb aller Gruppen nahm der Anteil antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen im Verlauf ab, besonders deutlich in der Kontrollgruppe an Tag 14 gegenüber Tag 7.

4.2.2 Stärke der gesamten CD8⁺-T-Zell-Immunantwort

Zur Untersuchung der Stärke der Gesamt-T-Zell-Immunantwort wurde mittels CD11a der Anteil aktivierter CD8⁺-T-Zellen (CD11a⁺⁺⁺) bestimmt.

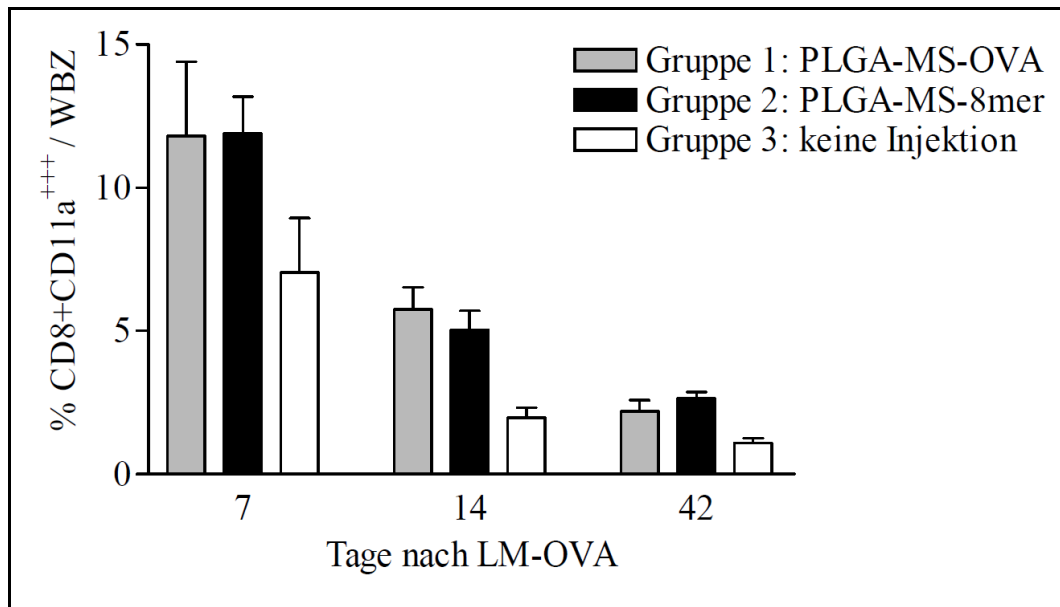


Abbildung 14: Gesamtprotein im Vergleich mit Oktamer: Gesamt-CD8⁺-T-Zell-Immunantwort. Dargestellt ist der Anteil CD11a-hochpositiver CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten in % (MW \pm SEM; Gruppen 1, 2: n = 4; Gruppe 3: n = 3) zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 = LM-OVA-Injektion).

Hinsichtlich des Anteils CD11a-hochpositiver CD8⁺-T-Zellen zeigte sich die gleiche Reihenfolge wie auch für die SIINFEKL-spezifischen CD8⁺-T-Zellen, insbesondere mit nur recht geringen Unterschieden zwischen den beiden Vergleichsgruppen, die unterschiedlich langes Peptidantigen erhalten hatten.

5 Auswirkung der Größe im Priming eingesetzter PLGA-Mikrosphären auf die induzierbare Immunantwort

PLGA-Mikrosphären wurden im Rahmen dieser Arbeit darauf untersucht, wie sie als T-Zell-immunogene Applikationsform für Peptidantigene einen größtmöglichen Nutzen im Sinne einer starken Immunreaktion haben könnten. Sie kommen dafür in Frage, weil sie ein interessantes Mittel sind, die für die primäre T-Zell-Aktivierung erforderliche Stimulation dendritischer Zellen zu bewirken (vgl. Kapitel I). Insofern stellt sich die Frage, ob Phagozytose und anschließende Prozessierung des Antigens durch die DC bei PLGA-MS unterschiedlicher Größe mit ähnlicher Wirkung erfolgen können oder ob sich eine bestimmte Größe für das mit dieser Arbeit untersuchte Vakzinierungsprotokoll besonders gut eignet. Mit den nachfolgend dargestellten Versuchen wurde *in vivo* untersucht, ob und ggf. wie sich die Größe der für den primären Antigenkontakt verwendeten PLGA-

Mikrosphären auf die Stärke der CD8⁺-T-Zell-Immunantwort auswirkt.

5.1 Vier Sorten PLGA-Mikrosphären unterschiedlichen Durchmessers

Hierzu wurden vier Gruppen verglichen, die am ersten Tag des Versuchs (Tag -7) an jeweils unterschiedlich große PLGA-Mikrosphären (250 µm, 20 µm, 2 µm, 0,2 µm) gebundenes SIINFEKL-Peptid erhielten. Die Beladung erfolgte jeweils nach dem gleichen Verfahren bei Verwendung von 1 mg PLGA und 100 µg SIINFEKL-Peptid je Tier. Alle Gruppen erhielten 7 Tage später LM-OVA (Tag 0). Bestimmungen der Immunantwort erfolgten durch Auswertung von Blutproben 8, 15 und 43 Tage nach Injektion von LM-OVA (Tag 8, 15 bzw. 43).

5.1.1 Stärke der spezifischen CD8⁺-T-Zell-Immunantwort

Zur Bestimmung der Stärke der spezifischen Immunantwort gegen das Modellantigen Ovalbumin wurde der Anteil antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten bestimmt.

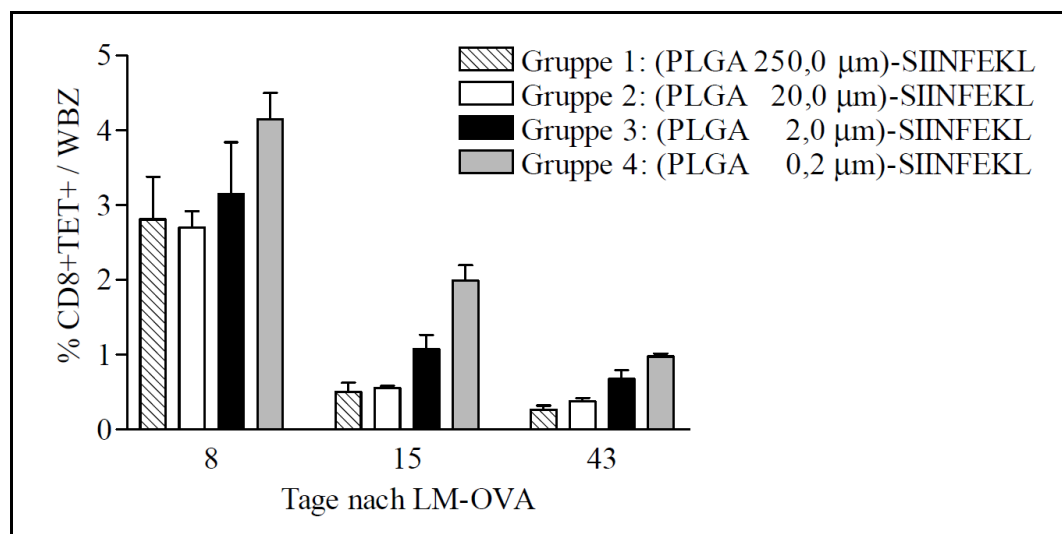


Abbildung 15: Vergleich von 4 Größen PLGA-MS: Spezifische CD8⁺-T-Zell-Immunantwort. Dargestellt ist der Anteil SIINFEKL-spezifischer CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten in % (MW ± SEM; Gruppen 1, 4: n = 5; Gruppen 2, 3: n = 3) zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 = LM-OVA-Injektion).

Zu allen Bestimmungszeitpunkten zeigten die Gruppen, die PLGA-Mikrosphären von 20 µm oder 250 µm erhalten hatten, die geringsten Anteile antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen, während den jeweils größten Anteil die Gruppe aufwies, die PLGA-Mikrosphären von 0,2 µm erhalten hatte. Deren Population war an Tag 15 und Tag 43 jeweils gegenüber allen anderen Gruppen statistisch signifikant größer.

5.1.2 Stärke der gesamten CD8⁺-T-Zell-Immunantwort

Zur Untersuchung der Stärke der Gesamt-T-Zell-Immunantwort wurde mittels CD11a der Anteil aktivierter CD8⁺-T-Zellen (CD11a⁺⁺⁺) bestimmt.

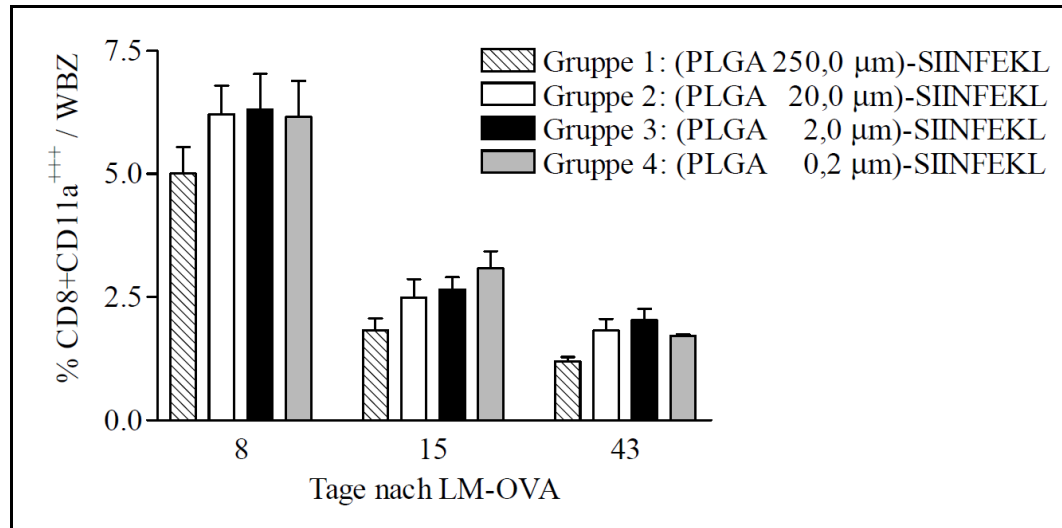


Abbildung 16: Vergleich von 4 Größen PLGA-MS: Gesamt-CD8⁺-T-Zell-Immunantwort. Dargestellt ist der Anteil CD11a-hochpositiver CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten in % (MW ± SEM; Gruppen 1, 4: n = 5; Gruppen 2, 3: n = 3) zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 = LM-OVA-Injektion).

Zu allen Bestimmungszeitpunkten zeigte die Gruppe, die die größten Mikrosphären (250 µm) erhalten hatte, den geringsten Anteil CD11a-hochpositiver CD8⁺-T-Zellen. Allgemein aber waren die Unterschiede zwischen den Gruppen recht gering und lassen, anders als der Anteil antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen, keine eindeutige Tendenz erkennen.

5.2 PLGA-Mikrosphären von 2,0 µm und 0,2 µm im Vergleich

In einem weiteren Experiment wurden zwei Gruppen verglichen, von denen eine an Tag -7 PLGA-Mikrosphären von 2,0 µm, die andere von 0,2 µm Durchmesser erhielt (jeweils 1 mg PLGA je Tier). Die Beladung erfolgte nach dem gleichen Verfahren und mit der gleichen Menge SIINFEKL-Peptid. Beide Gruppen erhielten 7 Tage später (Tag 0) LM-OVA. Eine Kontrollgruppe erhielt an Tag 0 LM-OVA, aber keine Injektion an Tag -7. Bestimmungen der Immunantwort erfolgten durch Auswertung von Blutproben 7, 14 und 42 Tage nach Injektion von LM-OVA (Tag 7, 14 bzw. 42).

5.2.1 Stärke der spezifischen CD8⁺-T-Zell-Immunantwort

Zur Bestimmung der Stärke der spezifischen Immunantwort gegen das Modellantigen Ovalbumin wurde der Anteil antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten bestimmt.

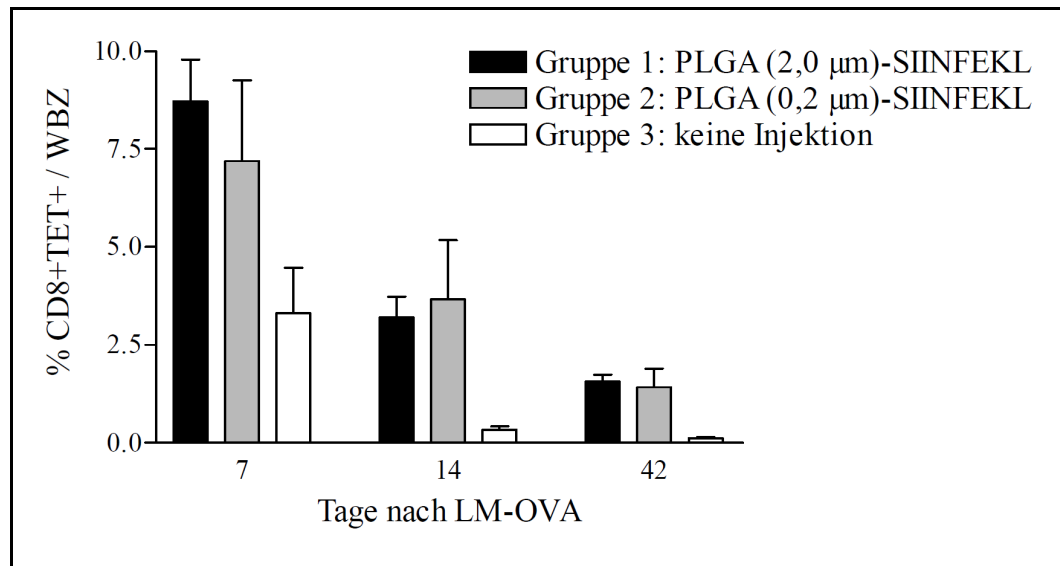


Abbildung 17: Vergleich von 2 Größen PLGA-MS: Spezifische CD8⁺-T-Zell-Immunantwort. Dargestellt ist der Anteil SIINFEKL-spezifischer CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten in % (MW ± SEM; Gruppen 1, 2: n = 4; Gruppe 3: n = 3) zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 = LM-OVA-Injektion).

Insgesamt zeigten sich hinsichtlich der spezifischen CD8⁺-T-Zell-Antwort zwischen den beiden Vergleichsgruppen mit verschiedenen großen Mikrosphären nur geringe Unterschiede, die zu keinem Bestimmungszeitpunkt statistisch signifikant waren. Während an Tag 7 und Tag 42 die Gruppe, die PLGA-Mikrosphären mit einem Durchmesser von 2,0 µm erhalten hatte, den größeren Anteil antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen aufwies, war dieser Anteil an Tag 14 in der Gruppe mit den 0,2 µm-Mikrosphären geringgradig höher.

In allen Gruppen nahm der Anteil antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen im Verlauf ab, besonders deutlich in der Kontrollgruppe von Tag 7 auf Tag 14.

5.2.2 Stärke der gesamten CD8⁺-T-Zell-Immunantwort

Zur Untersuchung der Stärke der Gesamt-T-Zell-Immunantwort wurde mittels CD11a der Anteil aktivierter CD8⁺-T-Zellen (CD11a⁺⁺⁺) bestimmt.

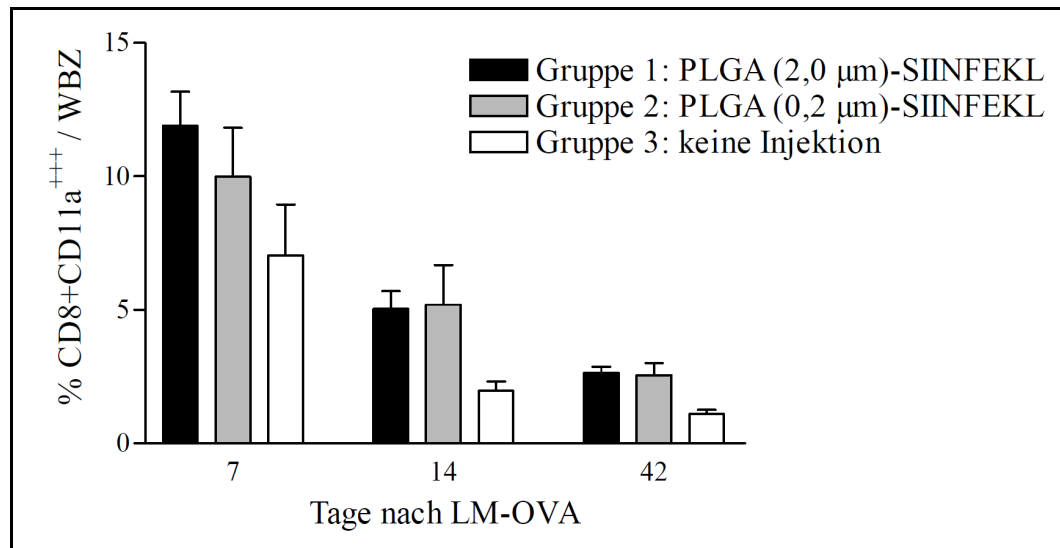


Abbildung 18: Vergleich von 2 Größen PLGA-MS: Gesamt-CD8⁺-T-Zell-Immunantwort. Dargestellt ist der Anteil CD11a-hochpositiver CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten in % (MW ± SEM; Gruppen 1, 2: n = 4; Gruppe 3: n = 3) zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 = LM-OVA-Injektion).

Hinsichtlich des Anteils CD11a-hochpositiver CD8⁺-T-Zellen zeigte sich die gleiche Reihenfolge wie für die SIINFEKL-spezifischen CD8⁺-T-Zellen, insbesondere mit nur geringen Unterschieden zwischen den Vergleichsgruppen, die unterschiedlich große PLGA-Mikrosphären erhalten hatten.

6 Durch Boosting induzierbare T-Zell-Antworten nach verschiedenen Injektionsarten für PLGA-Mikrosphären im Priming

Mit Blick auf einen möglichen Einsatz in der klinischen Praxis ist ein immunologisch geeigneter und zugleich praktikabler Verabreichungsweg erforderlich. Mit diesem Versuch wurde in vivo untersucht, welche Verabreichungswege für mittels PLGA-MS gegebene Peptidantigene in Betracht kommen und ob mit dem Ziel einer durch Kurzzeit-Intervall-Boosting mit LM-OVA zu induzierenden, möglichst starken CD8⁺-T-Zell-Immunantwort ggf. eine Methode zu bevorzugen sein würde.

Als Applikationswege wurden Injektion i. m., s. c. und i. v. gegenübergestellt. Eine Kontrollgruppe erhielt kein PLGA-gebundenes Antigen.

Bestimmungen der Immunantwort erfolgten durch Auswertung von Blutproben 7, 13 und 42 Tage nach Injektion von LM-OVA (Tag 7, 13 bzw. 42).

6.1 Stärke der spezifischen CD8⁺-T-Zell-Immunantwort

Zur Bestimmung der Stärke der spezifischen Immunantwort gegen das Modellantigen Ovalbumin wurde der Anteil antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten bestimmt.

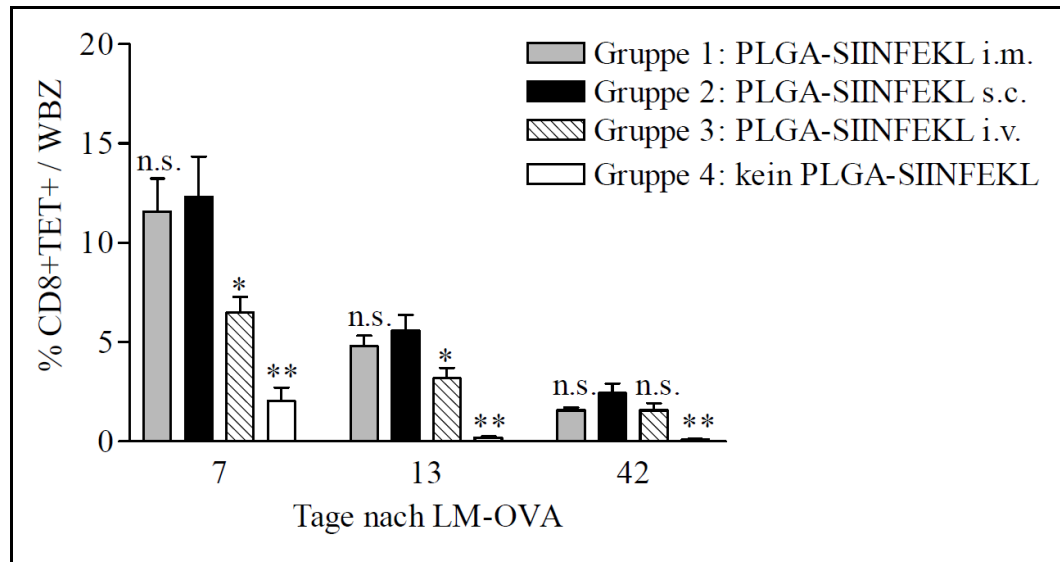


Abbildung 19: Verschiedene Applikationsarten für PLGA: Spezifische CD8⁺-T-Zell-Immunantwort. Dargestellt ist der Anteil SIINFEKL-spezifischer CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten in % (MW ± SEM; Gruppen 1, 3: n = 3; Gruppen 2, 4: n = 4) zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 = LM-OVA-Injektion); statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$).

Es zeigte sich, daß der Anteil SIINFEKL-spezifischer CD8⁺-T-Zellen zu allen Bestimmungszeitpunkten in der Gruppe mit Injektion s. c. am höchsten war, am geringsten bei den Tieren der Kontrollgruppe.

An Tag 7 und Tag 13 waren die Werte der s. c.-Gruppe signifikant höher als die der i. v.-Gruppe, an Tag 42 nicht. Gegenüber der Kontrollgruppe waren die Werte aller anderen Gruppen zu allen Bestimmungszeitpunkten jeweils signifikant höher.

6.2 Stärke der gesamten CD8⁺-T-Zell-Immunantwort

Zur Untersuchung der Stärke der Gesamt-T-Zell-Immunantwort wurde mittels CD11a der Anteil aktivierter CD8⁺-T-Zellen (CD11a⁺⁺⁺) bestimmt.

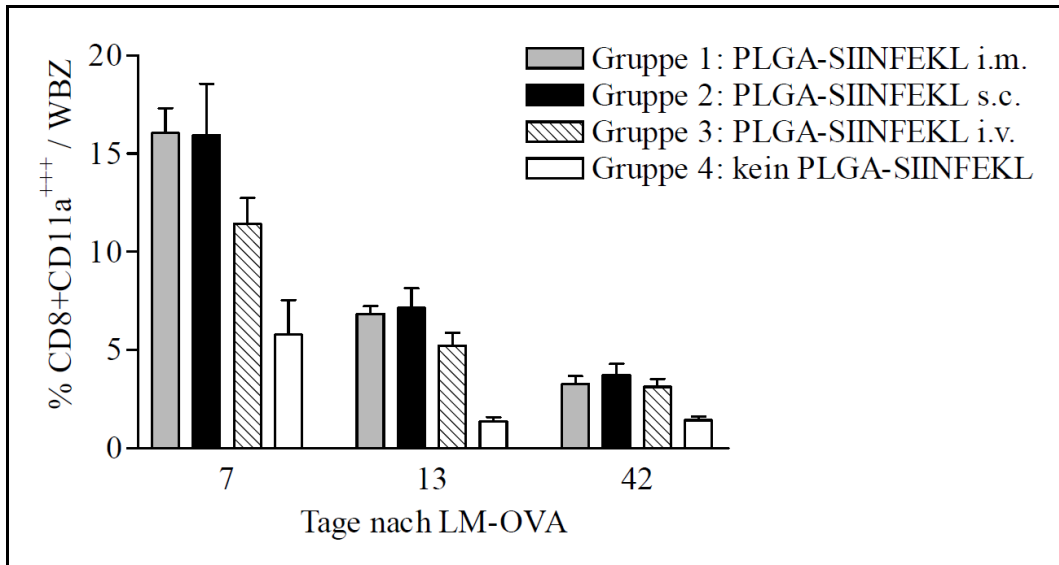


Abbildung 20: Verschiedene Applikationsarten für PLGA: Gesamt-CD8⁺-T-Zell-Immunantwort. Dargestellt ist der Anteil CD11a-hochpositiver CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten in % (MW ± SEM; Gruppen 1, 3: n = 3; Gruppen 2, 4: n = 4) zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 = LM-OVA-Injektion).

In allen Gruppen war der Anteil der CD11a-hochpositiven CD8⁺-T-Zellen an Tag 7 am höchsten und am geringsten an Tag 42 (Ausnahme: Gruppe 4, in der der Wert an Tag 42 geringgradig höher war als an Tag 13). Wesentliche Unterschiede stellten sich unter den Vergleichsgruppen (Gruppen 1, 2 und 3) nicht heraus.

7 Einfluß von Poly(I:C) auf Priming mit PLGA-Mikrosphären im Vergleich zu Priming mit dendritischen Zellen

In den bisher dargestellten Versuchen erfolgte die Verabreichung von Antigen mittels PLGA-Mikrosphären ohne weitere Adjuvanzen, insbesondere ohne unspezifische Immunstimulanzen, die in Vakzinierungen mit Peptidantigen häufig eingesetzt werden (vgl. Kapitel I). Vor allem auch mit Blick auf vorliegende Daten bezüglich dieses Einsatzes bei DC-Vakzinierungen war von Interesse, wie sich im untersuchten Kurzzeit-Boosting-Protokoll die zusätzliche Gabe von Immunstimulanzen bei PLGA-Priming auswirkt.

Hierzu wurde in vivo der Einfluß zusätzlicher Gabe des TLR-3-Liganden Poly(I:C) (200 µg je Tier) zum Zeitpunkt des Primings auf die Stärke der CD8⁺-T-Zell-Immunantwort bestimmt und im Vergleich zu entsprechender Vakzinierung mit dendritischen Zellen anstatt mit PLGA-MS betrachtet. Es wurden vier Gruppen untersucht, die am ersten Tag des Versuchs (Tag -7) eine erste Antigeninjektion (Priming) erhielten, 7 Tage später (Tag 0) eine zweite (Boosting).

Verschiedene Priming-Antigen-Träger in Kombination mit Poly(I:C)		
	Tag -7: Priming-Injektion	Tag 0: Boosting-Injektion
Gruppe 1	DC-SIINFEKL i. v.	attenuierte LM-OVA i. v.
Gruppe 2	DC-SIINFEKL i. v. + Poly(I:C) i. p.	attenuierte LM-OVA i. v.
Gruppe 3	PLGA-MS-SIINFEKL i. v.	attenuierte LM-OVA i. v.
Gruppe 4	PLGA-MS-SIINFEKL i. v. + Poly(I:C) i. p.	attenuierte LM-OVA i. v.

Tabelle 2: Einfluß von Poly(I:C) auf Priming mit DC und PLGA-MS: Behandlungsschema.

Die Immunantwort wurde durch Auswertung von Blutproben 2 Tage vor sowie 7, 13 und 40 Tage nach LM-OVA-Injektion (Tag -2, 7, 13 bzw. 40) bestimmt.

7.1 Stärke der spezifischen CD8⁺-T-Zell-Immunantwort

Zur Bestimmung der Stärke der spezifischen Immunantwort gegen das Modellantigen Ovalbumin wurde der Anteil antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten bestimmt.

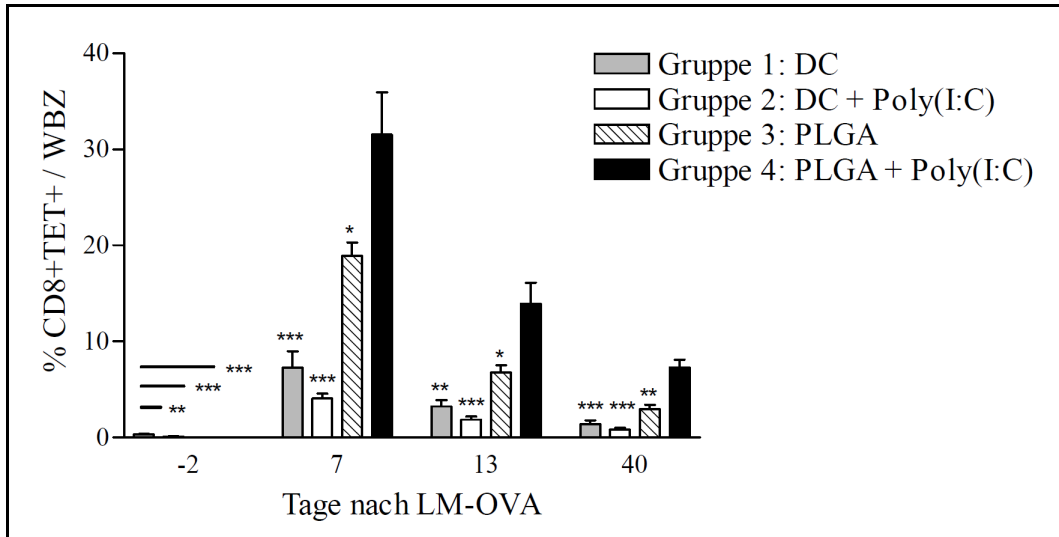


Abbildung 21: Einfluß von Poly(I:C) auf Priming mit DC und PLGA-MS: Spezifische CD8⁺-T-Zell-Immunantwort. Dargestellt ist der Anteil SIINFEKL-spezifischer CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten in % (MW ± SEM; Gruppen 1, 2, 4: n = 5; Gruppe 3: n = 4) zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 = LM-OVA-Injektion); statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben (* = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,01; *** = p ≤ 0,001).

An Tag -2, also nach nur einmaligem Antigenkontakt und ohne Verabreichung eines Pathogens, waren SIINFEKL-spezifische CD8⁺-T-Zell-Populationen, wenn auch vergleichsweise geringe, nur in den DC-Gruppen detektierbar, nicht aber in den PLGA-Gruppen. Allerdings zeigte sich Gruppe 1 mit einem Anteil von 0,33 ± 0,043 % (MW ± SEM) antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen als deutlich stärkste Gruppe. Der Unterschied war gegenüber allen anderen Gruppen signifikant. Bei allen Bestimmungen nach dem zweiten Antigenkontakt zeigte Gruppe 4 (SIINFEKL an PLGA-Mikrosphären i. v., zusätzlich Poly(I:C) i. p.) jeweils den deutlich höchsten Anteil antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten. Die jeweils zweitstärkste Gruppe war Gruppe 3 (SIINFEKL an PLGA-Mikrosphären i. v.). Die antigenspezifische CD8⁺-T-Zell-Immunantwort war zu allen Bestimmungszeitpunkten in Gruppe 1 (SIINFEKL an DC gebunden i. v.) stärker als in Gruppe 2 (SIINFEKL an DC gebunden i. v., zusätzlich Poly(I:C) i. p.). In Gruppe 4 war der Anteil SIINFEKL-spezifischer

CD8⁺-T-Zellen gegenüber allen Vergleichsgruppen signifikant höher.

7.2 Stärke der gesamten CD8⁺-T-Zell-Immunantwort

Zur Untersuchung der Stärke der Gesamt-T-Zell-Immunantwort wurde mittels CD11a der Anteil aktivierter CD8⁺-T-Zellen (CD11a⁺⁺⁺) bestimmt.

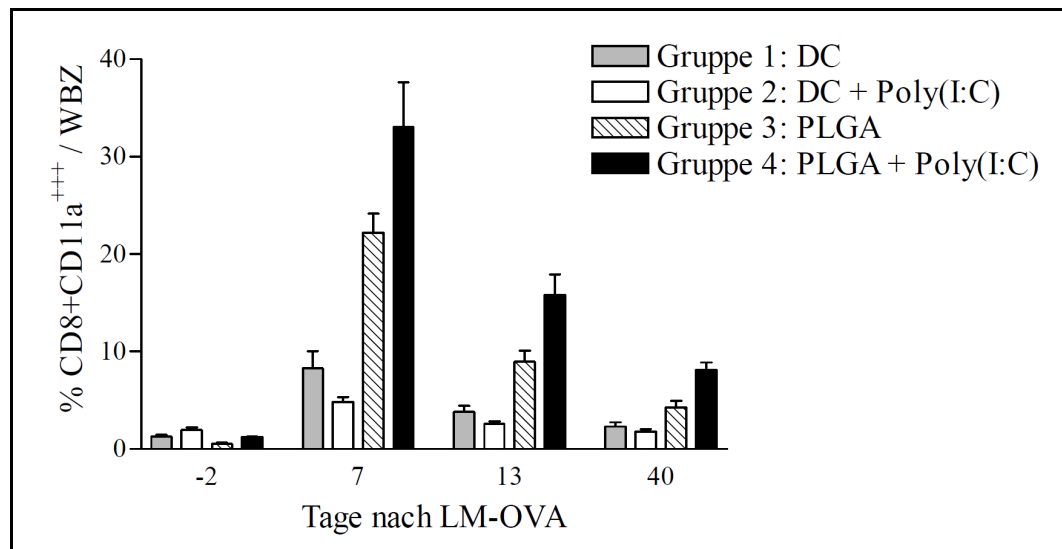


Abbildung 22: Einfluß von Poly(I:C) auf Priming mit DC und PLGA-MS: Gesamt-CD8⁺-T-Zell-Immunantwort. Dargestellt ist der Anteil CD11a-hochpositiver CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Bluteukozyten in % (MW ± SEM; Gruppen 1, 2, 4: n = 5; Gruppe 3: n = 4) zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 = LM-OVA-Injektion).

Vor der Injektion von LM-OVA, also nach Antigen-, aber ohne Pathogenkontakt, zeigten alle Gruppen nur geringe Anteile an CD8⁺CD11a⁺⁺⁺-T-Zellen. Den höchsten Wert wies Gruppe 2 (SIINFEKL an DC, zusätzlich Poly(I:C)) auf, den niedrigsten Wert Gruppe 3 (SIINFEKL an PLGA-Mikrosphären, ohne Poly(I:C)).

Nach LM-OVA-Injektion wurde in allen Gruppen ein deutlich höherer Anteil CD11a-hochpositiver CD8⁺-T-Zellen gemessen. Dieser Anteil war bei allen Gruppen an Tag 7 am höchsten und fiel dann an den Tagen 13 und 40 ab. Zu allen Bestimmungszeitpunkten nach LM-OVA-Gabe war er am höchsten in Gruppe 4, es folgten jeweils mit geringeren Anteilen die Gruppen 3, 1 und 2.

7.3 Anteil antigenspezifischer Zellen an CD8⁺-T-Zell-Population

Durch Bestimmung des Anteils aller CD8⁺-T-Zellen, also aktivierter und nichtaktivierter CD8⁺-T-Zellen, konnte der Anteil der modellantigenspezifischen Zellen an der CD8⁺-T-Zell-Population errechnet werden. Dabei war nach LM-OVA-Gabe der Anteil der SIINFEKL-spezifischen an der CD8⁺-T-Zell-Population jeweils in Gruppe 4 am höchsten, gefolgt von den Gruppen 3, 1 und 2.

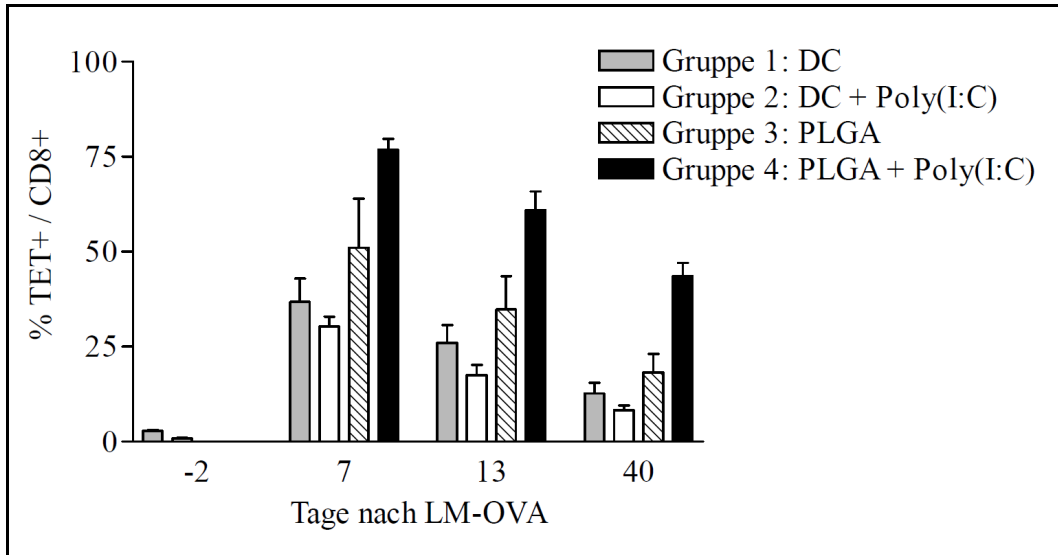


Abbildung 23: Einfluß von Poly(I:C) auf Priming mit DC und PLGA-MS: Anteil SIINFEKL-spezifischer an der Gesamtzahl der CD8⁺-T-Zellen. Dargestellt ist der Anteil SIINFEKL-spezifischer CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8⁺-T-Zellen in % (MW ± SEM; Gruppen 1, 2, 4: n = 5; Gruppe 3: n = 4) zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 = LM-OVA-Injektion).

7.4 Phänotypische Charakterisierung der T-Zell-Immunantwort

Anhand der Oberflächenproteine CD127 und KLRG1 als Marker (siehe auch Abschnitt 2.3) wurde der Charakter der spezifischen T-Zell-Immunantwort vor der LM-OVA-Injektion, also nach primärem, aber vor sekundärem Antigenkontakt, näher bestimmt und entsprechenden Werten nach der LM-OVA-Injektion gegenübergestellt.

Weil eine SIINFEKL-spezifische CD8⁺-T-Zell-Population an Tag -2 nur in den DC-Gruppen identifizierbar war, können diese Werte auch nur für diese Gruppen verglichen werden.

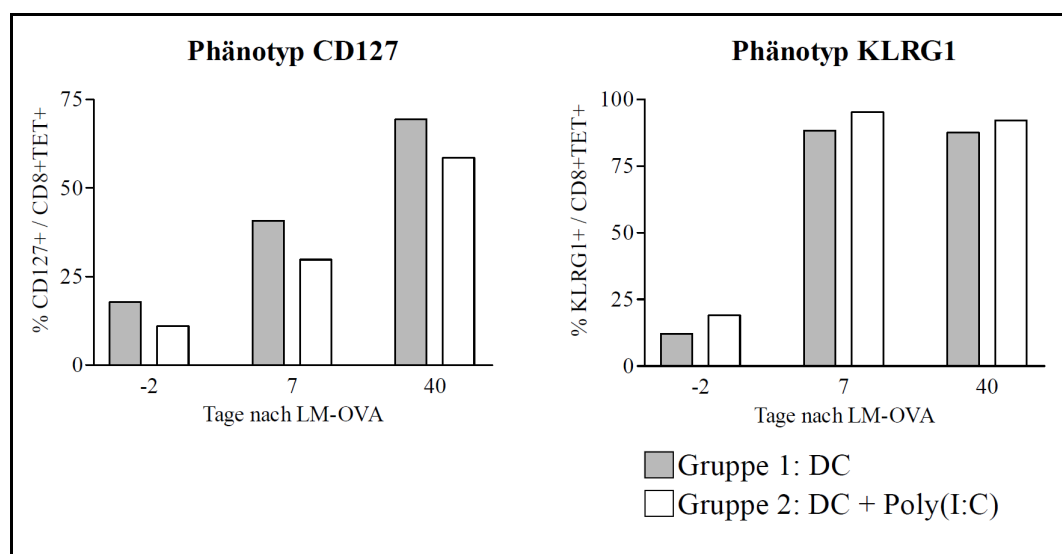


Abbildung 24: Einfluß von Poly(I:C) auf Priming mit DC: Phänotypisierung der spezifischen CD8⁺-T-Zell-Immunantwort anhand der Oberflächenmarker CD127 und KLRG1. Dargestellt ist jeweils für die Sammelprobe einer Gruppe in % der Anteil der SIINFEKL-spezifischen CD8⁺-T-Zellen, die den Marker exprimieren.

Es zeigte sich, daß der Anteil der die untersuchten Oberflächenmarker CD127 und KLRG1 exprimierenden CD8⁺-T-Zellen innerhalb der SIINFEKL-spezifischen CD8⁺-T-Zell-Population nach primärem Antigenkontakt (Tag -2) in beiden Gruppen deutlich geringer war als bei zwei Bestimmungen nach dem sekundären Antigenkontakt in Form von LM-OVA (Tag 7 und Tag 40). Damit bestätigte sich bei durch Poly(I:C)-Gabe erwartetem Verhältnis der Gruppen zueinander an den jeweiligen Bestimmungstagen auch phänotypisch das Vorliegen einer sekundären Immunantwort nach der Injektion von LM-OVA (vgl. auch Ausführungen unter 2.3).

8 Ausmaß der T-Zell-Immunogenität des untersuchten Vakzinierungsansatzes in einem Modell mit Autoantigen

Für den Einsatz von Immuntherapie gegen Tumoren ist ein wesentlicher Aspekt, daß mit der Vakzinierung eine Immunantwort nicht gegen Fremdagene, sondern gegen Autoantigene erreicht werden muß, deren Induzierung weitaus schwieriger ist (Berzofsky et al., 2004).

Mit Hilfe genetisch modifizierter Mäuse (vgl. auch II.1.4) wurde in vivo untersucht, ob und in welchem Ausmaß es möglich ist, mittels des definierten und weiter erprobten Kurzzeit-Intervall-Boostings auch bei solchen Tieren OVA-spezifische CD8⁺-T-Zell-Immunantworten hervorzurufen, für die OVA kein Fremdagene ist. Hierzu wurde eine Gruppe von Tieren benutzt, auf deren Leberzellen OVA exprimiert wird, nicht aber auf anderen somatischen Zellen (Gruppe 1). Diese genetische Konstruktion basiert auf dem Cre-Flox-System, über dessen Koppelung an Albumin (Alb) gewährleistet wird, daß die AlbCre⁺/OVA⁺-Tiere OVA nur auf Hepatozyten exprimieren. Als Kontrollgruppen wurden AlbCre⁻/OVA⁺-Tiere (Gruppe 2), AlbCre⁺/OVA⁻-Tiere (Gruppe 3) eingesetzt sowie Wildtyp-Tiere (Gruppe 4). Für diese Gruppen war also OVA kein Autoantigen, sondern Fremdagene.

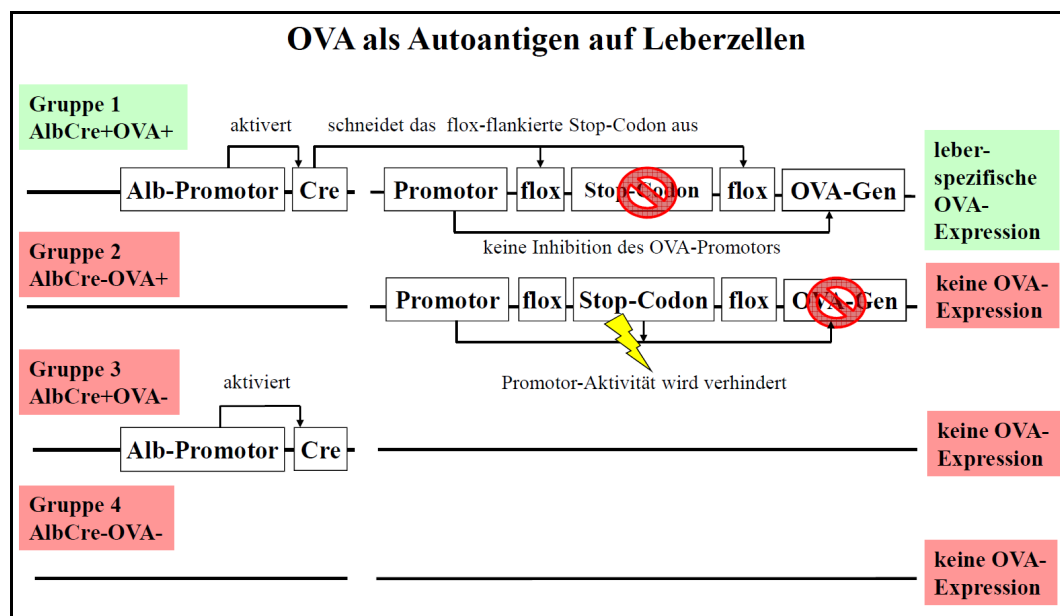


Abbildung 25: Genetische Konstruktion der Versuchsgruppen

Der zweimalige Antigenkontakt erfolgte für alle Gruppen in gleicher Weise mit SIINFEKL-Peptid an PLGA-Mikrosphären an Tag -7 sowie LM-OVA an Tag 0.

Bestimmungen der Immunantwort erfolgten durch Auswertung von Blutproben 7, 14 und 42 Tage nach Injektion von LM-OVA (Tag 7, 14 bzw. 42).

8.1 Stärke der spezifischen $CD8^+$ -T-Zell-Immunantwort

Zur Bestimmung der Stärke der spezifischen Immunantwort gegen das Modellantigen Ovalbumin wurde der Anteil antigenspezifischer $CD8^+$ -T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten bestimmt.

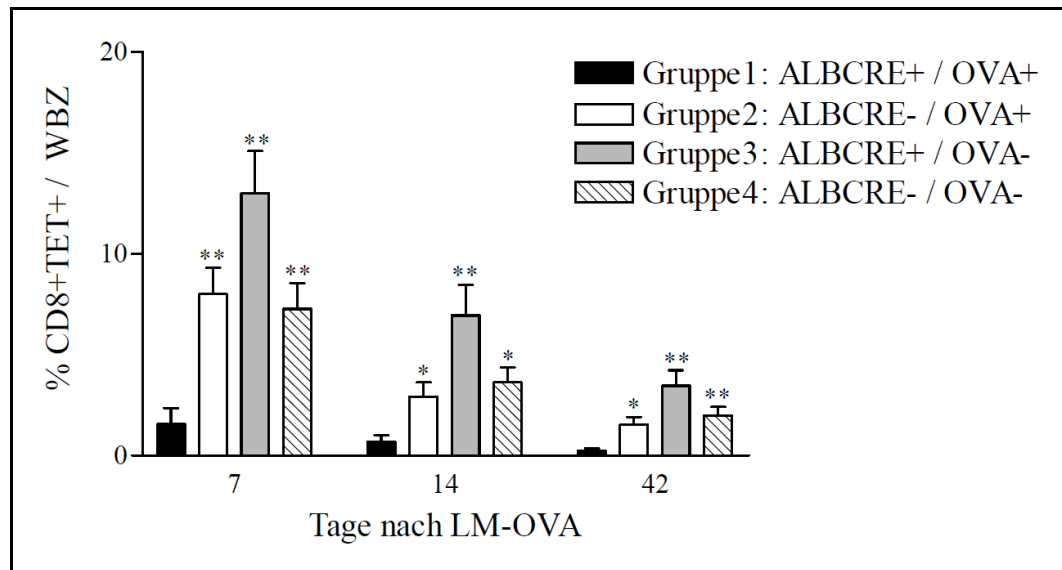


Abbildung 26: Ovalbumin als Autoantigen: SIINFEKL-spezifische $CD8^+$ -T-Zell-Immunantwort. Dargestellt ist der Anteil SIINFEKL-spezifischer $CD8^+$ -T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten in % (MW \pm SEM; Gruppe 1: n = 4; Gruppen 2, 4: n = 5; Gruppe 3: n = 6) zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 = LM-OVA-Injektion); statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$).

Es zeigte sich, daß zu allen Bestimmungszeitpunkten die antigenspezifische $CD8^+$ -T-Zell-Immunantwort in den Gruppen 2, 3 und 4 mit signifikantem Unterschied höher war als in Gruppe 1.

8.2 Stärke der gesamten CD8⁺-T-Zell-Immunantwort

Zur Untersuchung der Stärke der Gesamt-T-Zell-Immunantwort wurde mittels CD11a der Anteil aktivierter CD8⁺-T-Zellen (CD11a⁺⁺⁺) bestimmt.

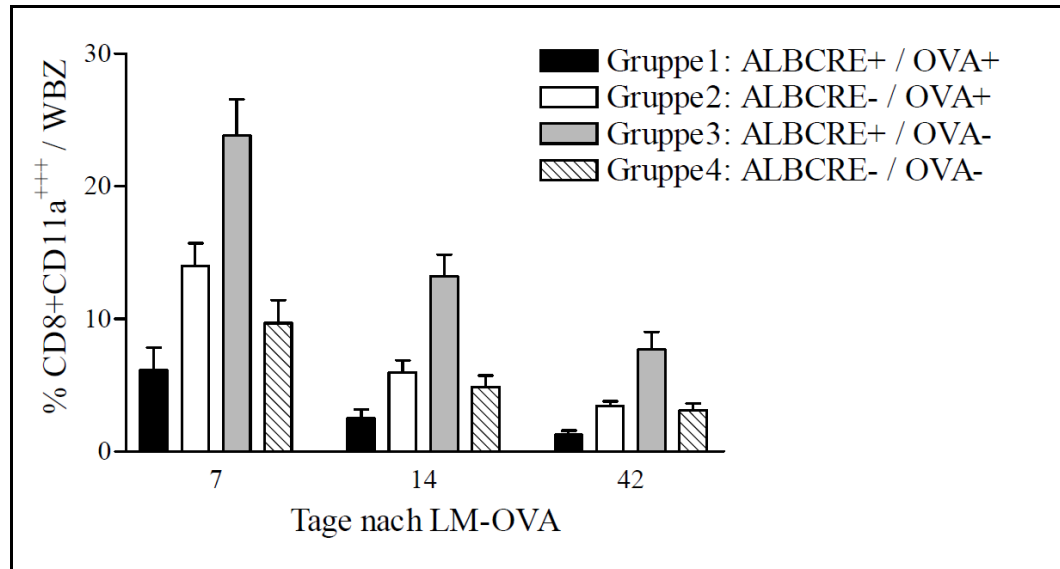


Abbildung 27: Ovalbumin als Autoantigen: Gesamt-CD8⁺-T-Zell-Immunantwort. Dargestellt ist der Anteil CD11a-hochpositiver CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzahl der Blutleukozyten in % (MW ± SEM; Gruppe 1: n = 4; Gruppen 2, 4: n = 5; Gruppe 3: n = 6) zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 = LM-OVA-Injektion).

Es zeigte sich, daß zu allen Bestimmungszeitpunkten der Anteil aktivierter CD8⁺-T-Zellen in den Gruppen 2, 3 und 4 deutlich höher war als in Gruppe 1.

8.3 Funktionalität der antigenspezifischen CD8⁺-T-Zellen

Zur Bestätigung, daß es sich bei den spezifischen CD8⁺-T-Gedächtniszellen um funktionelle T-Zellen handelt, wurden an Tag 70 alle Tiere des Versuchs getötet, die Milzen entnommen und aus diesen Einzelzellsate hergestellt, in denen die Zellen in vitro mit Modellantigen (durch Zugabe von SIINFEKL-Peptid) stimuliert wurden. Ein Kontrollansatz jeder Milzprobe erhielt diese Stimulation nicht, wurde ansonsten aber der gleichen Behandlung unterzogen (genauere Beschreibung siehe unter II.2.3.1.2).

Anschließend wurde mittels intrazellulär bindender Antikörper der Anteil der Milzleukozyten bestimmt, die auf die Stimulation mit SIINFEKL-Peptid mit Produktion der T-Zell-Funktionsmarker Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) reagierten.

8.3.1 Bestimmung des Anteils antigenspezifischer und aktivierter Milzleukozyten 70 Tage nach LM-OVA-Injektion

Zusätzlich wurde in den Einzelzelllysaten der Anteil der antigenspezifischen sowie aller aktivierten $CD8^+$ -T-Zellen bestimmt. Das Vorgehen erfolgte in der gleichen Weise, in der an den Tagen 7, 14 und 42 die Blutproben untersucht worden waren.

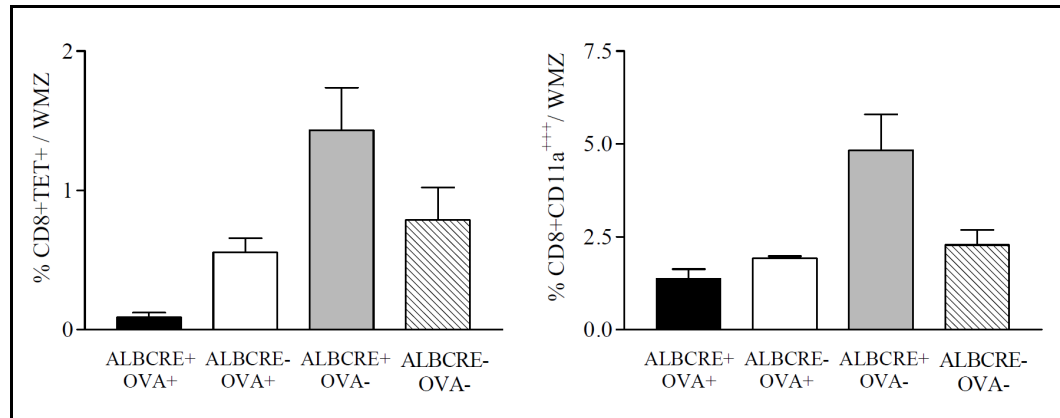


Abbildung 28: Ovalbumin als Autoantigen: SIINFEKL-spezifische und Gesamt- $CD8^+$ -T-Zell-Immunantwort an Tag 70. Dargestellt ist der Anteil SIINFEKL-spezifischer (links) sowie $CD11a$ -hochpositiver (rechts) $CD8^+$ -T-Zellen an der Gesamtzahl der Milzleukozyten in % (MW \pm SEM; Gruppe 1: n = 4; Gruppen 2, 4: n = 5; Gruppe 3: n = 6) an Tag 70 nach LM-OVA.

Es zeigte sich, daß der Anteil der antigenspezifischen $CD8^+$ -T-Zellen in Gruppe 3 (AlbCre⁺/OVA⁻) am höchsten war, am geringsten in Gruppe 1 (AlbCre⁺/OVA⁺). Die Verhältnisse der gemessenen Werte der Gruppen zueinander entsprechen etwa den Verhältnissen, die auch in den Blutproben an Tag 42 festgestellt worden waren. Gleiches gilt für die bei den einzelnen Tieren festgestellten Werte.

Zusätzlich wurde auch der Anteil der $CD11a$ -hochpositiven $CD8^+$ -T-Zellen ermittelt. Die für die antigenspezifische Färbung gemachten Feststellungen gelten entsprechend auch hier.

8.3.2 Bestimmung der Funktionsmarker IFN- γ , IL-2 und TNF- α in Milzleukozyten

Mittels intrazellulärer Färbung wurde für IFN- γ , IL-2 und TNF- α in den Einzelzelllysaten der Anteil der Milzleukozyten bestimmt, die auf Antigenstimulation mit SIINFEKL-Peptid in vitro mit Produktion des jeweiligen Zytokins reagierten.

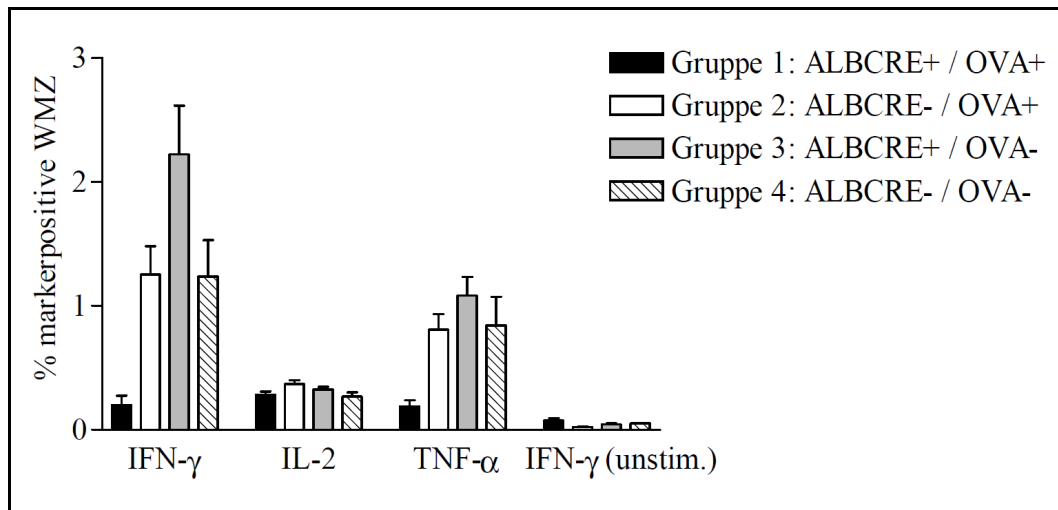


Abbildung 29: Ovalbumin als Autoantigen: Funktionsmarker spezifischer T-Gedächtniszellen in der Milz. Dargestellt ist der Anteil der nach In-Vitro-Antigenstimulation markerpositiven Zellen an der Gesamtzahl der Milzleukozyten in % (dargestellt MW \pm SEM; Gruppe 1: n = 4; Gruppen 2, 4: n = 5; Gruppe 3: n = 6) an Tag 70 nach LM-OVA; zum Vergleich: unstimulierte Kontrollgruppe.

Wie auch hinsichtlich des Anteils antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen zeigte Gruppe 3 den höchsten Anteil IFN- γ -positiver Leukozyten. Der Unterschied gegenüber den Werten für den jeweiligen Kontrollansatz, der keine Stimulation mit SIINFEKL-Peptid erhalten hatte, war in allen Gruppen signifikant.

Auch für den Marker TNF- α wurde der höchste Anteil positiver Zellen in Gruppe 3 festgestellt, der geringste in Gruppe 1. In allen Gruppen war der Anteil TNF- α -positiver Zellen geringer als der IFN- γ -positiver. In Gruppe 1 war dieser Unterschied allerdings deutlich geringer als in den anderen Gruppen.

Die gemessenen Werte für IL-2-positive Zellen waren in allen Gruppen außer Gruppe 1 deutlich geringer als die für die anderen Marker. Die festgestellten Werte für alle Gruppen unterschieden sich bezogen auf IL-2 nur vergleichsweise wenig und lassen keine Relation zu der Reihenfolge bezüglich anderer Marker erkennen. In den FACS-Darstellungen der Einzelproben waren, im Gegensatz zu den anderen Markern, für IL-2 eindeutig positive Zellpopulationen in keiner der Gruppen erkennbar.

IV DISKUSSION

Die nach wie vor nur unzureichenden Präventions- und Therapiemöglichkeiten von Infektionskrankheiten durch bestimmte intrazelluläre Erreger, gegen die eine „klassische“, antikörperbasierte Vakzinierungsstrategie nicht greift, wie auch gegen Tumoren verlangen nach geeigneten T-Zell-Vakzinierungen. Aus den oben dargestellten Experimenten ergeben sich Aspekte für die Entwicklung und Verbesserung neuartiger T-Zell-Vakzinierungsmodelle, die v. a. hinsichtlich der Stärke der induzierbaren Immunantwort, der schnellen Wirksamkeit, der guten Verfügbarkeit und nicht zuletzt der Kosten erhebliche Vorteile bedeuten könnten.

1 T-Zell-Boosting-Strategien mit PLGA-Mikrosphären

Die gezielte Induktion und Verstärkung spezifischer CD8⁺-T-Zell-Immunantworten zur Bekämpfung bestimmter Erkrankungen erfordert die Aktivierung dendritischer Zellen, die durch lösliche Peptidantigene nicht ausreichend erfolgen kann (Shen et al., 2006). Obwohl PLGA-Mikrosphären bereits seit einigen Jahren auch für den Einsatz im Menschen zugelassen sind, werden sie für Vakzinierungen noch nicht klinisch eingesetzt. Diverse Studien haben aber ihr immunogenes Potential unter Beweis gestellt. Dieses gilt es zu nutzen.

1.1 Sequenz und Art der Antigenverabreichung als entscheidender Punkt für ein pathogenbasiertes Kurzzeit-Boosting

Auch die nur einmalige Applikation von Peptidantigenen mittels PLGA-MS ohne Additive bewirkt in dendritischen Zellen Kreuzpräsentation, führt aber mangels Costimulation nicht zu einer ausreichenden Immunantwort im Sinne eines T-Zell-basierten prophylaktischen oder therapeutischen Effekts (vgl. Schlosser et al., 2008). Folglich wurde für T-Zell-Vakzinierung mit PLGA-MS der zusätzliche Einsatz von Adjuvantien als zwingend angesehen, für den als Alternative jüngst die Nutzung der sekundären Immunantwort durch eine Boosting-Injektion in die Debatte gebracht wurde (Pham et al., 2010). Grundlage jeder sekundären Immunantwort ist mehrfacher Antigenkontakt. In der vorliegenden Arbeit kommt als Modellantigen das Hühnereiweiß Ovalbumin zur Anwendung, teilweise an PLGA-MS gebunden, teilweise in Verbindung mit einem T-Zell-immunogenen

Pathogenvektor (OVA-exprimierenden *Listeria monocytogenes*). Durch unterschiedliche Kombination und Sequenz dieser Applikationsformen wurde untersucht, mit welchem Protokoll die besten sekundären T-Zell-Immunantworten erzielt werden können (siehe Abschnitt III.1).

Erwartungsgemäß waren spezifische CD8⁺-T-Zell-Populationen gegen das Modellantigen nach nur einmaligem Antigenkontakt (Tag -1) nur in den Gruppen erkennbar, die LM-OVA erhalten hatten. Ebenso konnte überhaupt eine nennenswerte Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen nach nur einmaliger Applikation von Antigen mittels PLGA-MS nicht festgestellt werden.

Die deutlich stärksten sekundären Immunantworten zeigte die Gruppe, die an Tag -7 PLGA-SIINFEKL und an Tag 0 LM-OVA erhalten hatte, also einen nichtinflammatorischen Erststimulus und einen starken systemisch-inflammatorischen Zweitstimulus. Es folgte mit einigem Abstand die Gruppe mit zweimaliger LM-OVA-Injektion. Alle anderen Gruppen hatten, insbesondere an Tag 13 und 42, vergleichsweise geringe Anteile spezifischer T-Gedächtniszellen.

Wenngleich die T-Zell-Immunantwort nach homologem Pathogen-Boosting mit LM-OVA an Tag 7 geringer war als die primäre Immunantwort an Tag -1, bleibt im Vergleich zu der Gruppe mit PLGA-Boosting zu konstatieren, daß die zweite LM-OVA-Gabe einen weit weniger starken Abfall der spezifischen und gesamten CD8⁺-T-Zell-Immunantwort bewirkte, also durchaus nicht bedeutungslos ist. Sowohl auf Priming mit Pathogenvektor wie auch mit PLGA-MS kann also ein Kurzzeit-Intervall-Boosting mit LM-OVA erfolgen, für das sich allerdings der heterologe Ansatz mit PLGA-Priming als deutlich überlegen herausgestellt hat. Entscheidend ist dabei die Reihenfolge der unterschiedlichen Stimuli. Mit einer nach LM-OVA erfolgten Gabe von Antigen an PLGA konnte kein Boosting-Effekt erreicht werden.

Daher sind PLGA-MS das Mittel der Wahl für die primäre Antigenverabreichung. T-Zell-immunogene Bedeutung unbeladener Mikrosphären im Zusammenhang mit LM-OVA-Gabe konnte, wie erwartet (vgl. Salvador et al., 2012), ausgeschlossen werden.

Damit konnte ein auch gegenüber mehreren Kontrollgruppen mit jeweils unterschiedlichem Priming (PLGA-OVA + LPS; gelöstes OVA; PLGA-BSA) bei gleichem Boosting beschriebener Effekt in der Effektorphase 7 Tage nach

sekundärer Antigengabe (Pham et al., 2010) nicht nur für sich stehend bestätigt werden, sondern seine Bedeutung auch in Relation zu anderen, homologen und heterologen, Ansätzen sowie für den weiteren Verlauf herausgestellt werden.

Aus diesen Ergebnissen könnte, bei Betonung der Notwendigkeit eines geeigneten partikulären Erststimulus, als Gedanke von allgemeiner immunologischer Bedeutung abzuleiten sein, daß sich der zweifelsohne T-Zell-immunogene, stark inflammatorische primäre Stimulus mit einem Pathogen (hier LM-OVA) nachteilig auf den Boosting-Effekt auswirkt.

Entsprechend wurde das heterologe Vorgehen mit PLGA-basiertem Priming und pathogenbasiertem Boosting auch für weitere Versuche als Standard angewendet.

1.2 Die Menge an Priming-Antigen beeinflusst Ausmaß und Charakter der sekundären Immunreaktion

Nachdem zunächst der Beladungsprozeß der Mikrosphären mit 100 µg Modellantigen (SIINFEKL-Peptid) je Tier durchgeführt worden war, wurde untersucht, welchen Effekt die Verwendung geringerer Mengen Antigen hat. Der hierzu konzipierte Titrationsversuch (siehe Abschnitt III.2) zeigte über den gesamten Verlauf, daß die jeweilige SIINFEKL-spezifische T-Zell-Antwort in der Ausgangsgruppe (100 µg SIINFEKL-Peptid je Tier) im Vergleich zu allen anderen Gruppen signifikant höher war (Abb. 6).

Dies deutet zum einen darauf hin, daß auch bei 100 µg SIINFEKL-Peptid dieses in Relation zu PLGA-Mikrosphären nicht im Überschuß eingesetzt wird. Zum anderen konnte damit gezeigt werden, daß die im Priming verwendete Menge Peptidantigen von Bedeutung für die Stärke der CD8⁺-T-Zell-Immunantwort ist.

Die phänotypische Auswertung über den Verlauf der sekundären Immunreaktion (Abb. 8) belegte indessen anhand mehrerer Marker, daß die mit dem Applikationsprotokoll erreichbaren, zahlenmäßig stärksten T-Zell-Immunantworten tatsächlich sekundäre Immunreaktionen sind. Zugleich bestätigt sie auch einen vermuteten qualitativen Unterschied (Wirth et al., 2010b), indem sich mit größerer Menge Peptidantigen ein geringerer Anteil zentraler T-Gedächtniszellen zeigte. Die Immunantworten der beiden Gruppen, die nur wenig Priming-Antigen erhalten hatten (1 µg bzw. 0,1 µg), ähnelten in Stärke und Charakter eher der primären Antwort in der LM-OVA-Kontrollgruppe und waren auch von dieser nicht signifikant abgrenzbar. Eine Mindestmenge Antigen ist also

auch, und möglicherweise im besonderen, für ein nichtinflammatorisches Priming erforderlich, wenn ein erfolgreiches Kurzzeit-Intervall-Boosting erfolgen soll.

Die Möglichkeit einer noch stärkeren Immunantwort durch eine größere Menge Priming-Antigen wurde in Betracht gezogen. Allerdings wurde mit 100 µg je Maus bereits ohnehin eine recht große Menge Antigen benutzt, zumal es sich bei Einsatz von SIINFEKL-Peptid um das H-2K^b-Epitop des Modellantigens Ovalbumin handelt, dessen Anzahl und Reinheitsgrad bei klinischen Anwendungen (z. B. mit Tumorlysat) niemals erreicht werden dürften. Daher und aus der Erwägung, daß die mit 100 µg Antigen je Tier erreichten spezifischen Antworten im eingesetzten Vakzinierungsmodell eine erhebliche Stärke erzielen konnten, wurde dieser Aspekt für die vorliegende Arbeit nicht weiter verfolgt.

1.3 PLGA-Mikrosphären im Vergleich zu dendritischen Zellen als primäre Antigen-träger vor einem Pathogen-Boosting

Wenngleich er trotz jahrzehntelanger Erforschung noch keine befriedigenden Resultate erreicht (Flinsenberg et al., 2011) und mit erheblichen Nachteilen einhergeht (s. o.), ist der einzige bisher klinisch etablierte Ansatz für die Induktion spezifischer T-Zell-Immunantworten die Antigenverabreichung mittels ex vivo beladener dendritischer Zellen. Daher ist der Nutzen von Vakzinierungen mittels synthetischer PLGA-Mikrosphären im Vergleich zu denen mittels DC zu beurteilen. Somit dürften die im Zusammenhang mit Pathogen-Boosting durchgeführten Vergleiche zwischen dem PLGA-basierten Ansatz einerseits und analoger DC-Vakzinierung andererseits (siehe III.3 und III.7) auch grundsätzliche Bedeutung für die Bewertung des Potentials dieser partikulären, aber nichtzellgebundenen Priming-Applikationsart haben.

Erwartungsgemäß (Badovinac et al., 2005) stellte sich nach DC-Priming ohne einen inflammatorischen Stimulus und vor LM-OVA-Gabe die primäre T-Zell-Immunantwort an Tag -2 als gering dar. Anders aber als nach PLGA-Priming konnte nach DC-Priming eine SIINFEKL-spezifische CD8⁺-T-Zell-Population detektiert werden (Abb. 9 und 21). Grund für diesen Unterschied könnte sein, daß die transferierten DC vor der Ex-Vivo-Beladung mit SIINFEKL-Peptid durch LPS-Gabe bereits in den Spendertieren einen aktivierenden Stimulus erhielten, was ihnen die für die Aktivierung naiver T-Zellen im Spendertier erforderliche costimulatorische Kompetenz verliehen haben könnte. Daß diese Stimulation nur

bei den transferierten, nicht aber bei den eigenen DC des Empfängertiers erfolgt ist, ist zugleich eine mögliche Erklärung für die im Vergleich z. B. zu einem Priming mit LM-OVA geringe Stärke dieser primären T-Zell-Immunantwort.

Die T-Zell-Immunantworten waren nach Gabe von LM-OVA sowohl bei DC- wie bei PLGA-Priming jeweils deutlich stärker, wobei v. a. der Anteil SIINFEKL-spezifischer CD8⁺-T-Zellen in PLGA-Gruppen größer war als in DC-Gruppen (Abb. 9 und 21). Letztere Unterschiede waren bei nahezu allen Bestimmungen auch statistisch signifikant.

Die Vermutung, daß die nach LM-OVA-Gabe erheblich höheren T-Zell-Immunantworten tatsächlich auf den Boosting-Effekt zurückzuführen sind, konnte mittels phänotypischer Analyse der spezifischen CD8⁺-T-Zell-Populationen, in denen diese einen sekundären Charakter zeigten, bestätigt werden (Abb. 24). Sowohl in der DC-Gruppe als auch in der PLGA-Gruppe konnte also der Boosting-Effekt genutzt werden. Allerdings ist PLGA-Priming für das eingesetzte Kurzzeit-Intervall-Boosting mittels Pathogen offensichtlich besser geeignet als DC-Priming.

1.4 Modifikationen des PLGA-Primings zeigen immunologische und technologische Flexibilität des Vakzinierungssystems

Nachdem also nicht nur die Eignung des PLGA-Primings insbesondere auch für ein Kurzzeit-Boosting mit Pathogen gezeigt werden konnte, sondern dieses auch in der Stärke der T-Zell-Immunantwort dem analogen DC-Ansatz nicht nur nicht nachsteht, sondern ihn übertrifft, empfiehlt sich die weitere Verfolgung dieses Ansatzes. Mit Blick auf das Ziel des Einsatzes im Menschen sind auch praktische und technologische Aspekte von Interesse, im besonderen auch die Breite der Einsatzfähigkeit und die geringe Anfälligkeit des Systems bei Modifikationen.

1.4.1 Unterschiedliche Applikationsarten im Priming schaffen ähnliche Voraussetzungen für Kurzzeit-Boosting

Naturgemäß ist für alle in einen Organismus einzubringenden Stoffe der Verabreichungsweg von besonderer praktischer Bedeutung. Gesichtspunkten wie Praktikabilität und erwünschter geringer Invasivität stehen oftmals die Erfordernisse der Erreichung einer optimalen Wirksamkeit entgegen. Grundsätzlich können Mikrosphären aus PLGA auf verschiedene Arten appliziert werden, insbesondere subkutan (z. B. von der FDA in den USA zugelassene

Depotpräparate). Für den im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Ansatz wurden für das PLGA-Priming drei Injektionsmethoden (i. m., s. c. und i. v.) auf ihre Eignung getestet und miteinander verglichen (siehe Abschnitt III.6). Dabei erwiesen sich alle als geeignet, indem sich SIINFEKL-spezifische wie auch Gesamt-CD8⁺-T-Zell-Immunantwort jeweils signifikant von der Kontrollgruppe ohne Priming abhoben.

Eine zu bevorzugende Applikationsart konnte nicht identifiziert werden. Wenngleich sich teilweise die s. c.-Applikation zu empfehlen schien, waren diese Unterschiede weder mit statistischer Signifikanz über den gesamten Verlauf vorhanden, v. a. nicht in der Gedächtnisphase (Abb. 19), noch im Vor- und Wiederholungsversuch reproduzierbar. Daher wurde, auch zur besseren Vergleichbarkeit mit bisherigen Daten sowie wegen sicherer Anwendbarkeit und Reproduzierbarkeit, für weitere Versuche die Injektion i. v. gewählt.

1.4.2 Kurzzeit-Boosting nach PLGA-Priming mit Peptidantigenen unterschiedlicher Dimension möglich

Der Nutzen eines Vakzinierungssystems für die Praxis ist um so höher, auf je mehr Antigene es grundsätzlich Anwendung finden kann. Seiner diesbezüglichen Flexibilität sollten möglichst nicht schon auf der Modellstufe seiner Entwicklung zu stark einschränkende Grenzen gesetzt sein.

Mit Ovalbumin (385 AS) wurde in der vorliegenden Arbeit ein in der immunologischen Forschung etabliertes Modellantigen verwendet, von dem standardmäßig für das Priming das MHC-Klasse-I-spezifische Epitop (Oktamer (8mer) mit der Sequenz SIINFEKL) eingesetzt wurde. Um den möglichen Einfluß der Peptidlänge auf die primäre Antigenverabreichung mittels PLGA-MS zu untersuchen, wurden einer Gruppe, die 8mer erhielt, Gruppen mit Gesamtprotein (FLP) und mit Eikosamer (20mer) gegenübergestellt. Dabei zeigte die FLP-Gruppe die stärkste T-Zell-Immunantwort, allerdings ohne statistische Signifikanz gegenüber der 8mer-Gruppe und der 20mer-Gruppe, zwischen denen die Unterschiede nur sehr gering waren (Abb. 11 und 12).

Bei der Interpretation dieser Werte ist zu bedenken, daß für die Beladung der PLGA-Mikrosphären jeweils die gleiche Masse (100 µg) Peptidantigen verwendet wurde. Hinsichtlich ihres Molekulargewichts jedoch unterscheiden sich die eingesetzten Peptide erheblich. Daher liegt die AS-Sequenz des T-Zell-

immunogenen H-2K^b-Epitops in 100 µg FLP in wesentlich geringerer Anzahl vor als in 100 µg 20mer oder 8mer. Diese Erwägung ist um so interessanter, als die FLP-Gruppe die stärksten Immunantworten aufwies. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte in unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften durch die unterschiedliche AS-Zusammensetzung liegen, die sich wiederum auf den Beladungsprozeß der PLGA-Mikrosphären auswirken könnte. Ebenfalls denkbar ist, daß neben dem H-2K^b-Epitop noch weitere Fragmente von OVA oder die proteolytische Antigenprozessierung an sich von Bedeutung sind. Diese wären in der FLP-Gruppe besonders stark vorhanden. In dem unter III.4.2 dargestellten Vergleich konnte allerdings ein möglicher Vorteil des FLP-Primings nicht bestätigt werden (Abb. 13). Für vertiefte Untersuchungen hierzu wären weitere Versuchskonzeptionen erforderlich und vermutlich auch von grundsätzlichem Interesse. Insofern es sich bei Ovalbumin um eine auf dem Weg zur klinischen Nutzung ohnehin zu überwindende Modellstufe handelt, wurde für die Fragestellung dieser Arbeit indessen die ausreichende Erkenntnis gewonnen, daß Priming mit SIINFEKL-Peptid sich auch im Vergleich mit Gesamtprotein im untersuchten Modell grundsätzlich bewährt.

Daß der Konjugationsprozeß an die Mikrosphären auch bei Verwendung von Peptidantigen ganz unterschiedlicher Größenordnung nicht aufwendig angepaßt werden muß und mit guter immunogener Wirkung möglich ist, könnte sich insbesondere für einen Einsatz mit Tumorlysate als Vorteil erweisen. PLGA-Mikrosphären haben sich auch unter diesem Aspekt für das getestete Modell als variables Instrument zur Antigenapplikation herausgestellt.

1.4.3 Partikuläre Antigengabe mittels PLGA muß Phagozytosekapazität der DC berücksichtigen, ist aber nicht zu eng festgelegt

Standardmäßig wurden für die durchgeführten Untersuchungen Mikrosphären eines Durchmessers von 2,0 µm verwendet, die in einem Versuch solchen von 0,2 µm, 20 µm sowie 250 µm gegenübergestellt wurden (siehe Abschnitt III.5.1). Die Stärke der Immunantworten nahm dabei tendenziell mit zunehmender Größe der Mikrosphären ab (Abb. 15), wobei die Unterschiede zwischen der 20 µm- und der 250 µm-Gruppe nur sehr gering und nicht statistisch signifikant waren. Deutlicher, wenngleich auch zu keinem Bestimmungszeitpunkt statistisch signifikant, waren die Unterschiede in der SIINFEKL-spezifischen Immunantwort als Reaktion auf die 2,0 µm- und die 0,2 µm-Mikrosphären im Vergleich zu der

Gruppe mit dem jeweils den nächstgrößeren Mikrosphären-Durchmesser.

Für die Interpretation dieser Ergebnisse könnte eine Rolle spielen, daß PLGA-Mikrosphären größeren Einzeldurchmessers bei der Verwendung in gleicher Masse eine geringere Gesamtoberfläche aufweisen. Dies könnte sich auf den Beladungsvorgang in dem Sinne auswirken, daß nur eine geringere Menge Antigen an sie gebunden werden kann.

Insgesamt jedoch kommen PLGA-Mikrosphären von 20 µm oder sogar 250 µm nicht für die phagozytotische Aufnahme durch DC im ganzen in Betracht, sondern dürften entweder als Depot kontinuierliche Stimulation bewirken (Heit et al., 2007) oder vor der Phagozytose in kleinere Teile zerlegt worden sein. Für das untersuchte Vakzinierungsmodell dürften sie also ohnehin weniger geeignet sein. Auch die v. a. in der Gedächtnisphase festgestellten geringeren SIINFEKL-spezifischen CD8⁺-T-Zell-Immunantworten weisen auf einen eher primären Charakter der T-Zell-Antwort hin und legen ihre weitere Erprobung nicht nahe.

Die leicht höhere Immunantwort bei Einsatz von 0,2 µm-Mikrosphären gegenüber 2,0 µm-Mikrosphären konnte in einem weiteren Versuch (siehe III.5.2) nicht bestätigt werden (Abb. 17). Insofern also weder die 0,2 µm- noch die 2,0 µm-Mikrosphären eindeutige Vorteile gezeigt haben, können beide, und damit auch der von ihnen umfaßte Größenordnungsbereich, als grundsätzlich geeignet für das untersuchte Vakzinierungskonzept angesehen werden. In ähnlichen Bereichen liegen auch die Angaben aus Berichten über andere PLGA-Vakzinierungen (Salvador et al., 2012; Waeckerle-Men et al., 2006).

2 Zusätzliche Gabe eines TLR-Liganden verstärkte die sekundäre Immunreaktion auch bei Kurzzeit-Boosting

Die dargestellten Ergebnisse belegen, daß es im untersuchten Ansatz mit PLGA-Mikrosphären zur Erzielung eines Boosting-Effekts keines systemisch-inflammatorischen Stimulus zum Priming-Zeitpunkt bedarf. Daß ein solcher Stimulus, z. B. durch ein Adjuvans, die Stärke einer sekundären Immunantwort sogar vermindern kann, ist für ein heterologes DC-Vakzinierungsmodell beschrieben, in dem ein TLR-9-Ligand eingesetzt wurde (Badovinac et al., 2005).

Im Lichte dieses Berichts war das Ergebnis des mit dieser Arbeit durchgeführten Vergleichs (siehe Abschnitt III.7) eines heterologen Boosting-Systems bei DC-

Priming einerseits mit und andererseits ohne einen TLR-Liganden wenig überraschend, auch wenn gewisse Unterschiede in der Versuchskonzeption bestanden. So zeigten Tiere, bei denen ein LM-OVA-Boosting auf eine primäre Antigenverabreichung mittels DC erfolgte, eine geringere spezifische und gesamte CD8⁺-T-Zell-Immunantwort, wenn ihnen zusätzlich am Priming-Termin der TLR-3-Ligand Poly(I:C) injiziert wurde. Diese der T-Zell-Immunantwort abträgliche Wirkung von Poly(I:C) zeigte sich sowohl in der primären wie auch in der sekundären Immunreaktion nach dem Boosting mit LM-OVA (Abb. 21 und 22).

Auch in Kombination mit Antigenverabreichungen mittels PLGA-MS wurden TLR-Liganden als unspezifische Immunstimulanzien mit der Wirkung einer stärkeren T-Zell-Immunantwort eingesetzt (Schlosser et al., 2008), allerdings nicht im Zusammenhang mit einem heterologen Boosting, so daß eine wesentliche Frage lautete, ob sich der erwünschte Boosting-Effekt, der mit dem definierten PLGA-Protokoll gut nutzbar war (s. o.), durch TLR-Liganden-Gabe würde unterstützen lassen. Angesichts der auch mit eigenem Versuch bestätigten Daten von Badovinac hinsichtlich DC-Vakzinierung (Badovinac et al., 2005) war die Aussicht auf einen solchen Erfolg mit Vorsicht zu beurteilen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das entwickelte Standard-Vakzinierungsprotokoll im Vergleich zu einer Gruppe untersucht, die zusätzlich zur primären PLGA-Antigenapplikation den TLR-3-Liganden Poly(I:C) erhielt. Erwartungsgemäß (s. o.) konnte nach PLGA-Priming ohne Poly(I:C)-Injektion an Tag -2 keine primäre antigenspezifische CD8⁺-T-Zell-Population detektiert werden (Abb. 21). Interessanterweise änderte daran auch die zusätzliche Gabe von Poly(I:C) nichts.

Im Kontrast dazu ergab sich hinsichtlich der für die Beurteilung eines Boosting-Konzepts entscheidenden sekundären Immunantwort nicht nur ein deutlicher Vorteil für beide PLGA-Gruppen gegenüber den DC-Gruppen, sondern auch die erheblich höhere, spezifische wie gesamte, T-Zell-Immunantwort für die Gruppe, die zeitgleich mit dem PLGA-Priming auch eine Poly(I:C)-Injektion erhalten hatte (Abb. 21 und 22). Ein Tier dieser Gruppe hatte an Tag 7 den Spitzenwert von 47,8 % SIINFEKL-spezifischen CD8⁺-T-Zellen in der Leukozytenpopulation.

Damit wirkte sich die zusätzliche Gabe des TLR-3-Liganden in den verglichenen

Trägersystemen (PLGA und DC) in gegenteiliger Weise aus. Während die zusätzliche Poly(I:C)-Gabe die Wirkung des PLGA-Primings verbesserte, verminderte sie die Wirkung des DC-Primings.

Ein Grund für diese Beobachtung könnte sein, daß die Beladung der DC mit dem Antigen „von außen“ über kompetitive Bindung bereits *in vitro* erfolgt war und diese DC in die Empfängertiere gegeben wurden, somit ein beschriebener stimulierender Einfluß von Poly(I:C) auf die Kreuzpräsentation exogener Antigene (Steinhagen et al., 2011) für diese transferierten DC nicht mehr greifen könnte. Ein solcher Einfluß wäre demgegenüber bei PLGA-Priming möglich.

Ein weiterer interessanter Aspekt zeigte sich in diesem Versuch hinsichtlich der Darreichungsform des TLR-Liganden: In anderen Ansätzen mit PLGA-Antigenapplikation wurden auch immunstimulatorische Adjuvantien partikulär (an PLGA-Mikrosphären konjugiert oder in sie eingeschlossen) gegeben, wobei die partikuläre Verabreichung als wichtiger Aspekt für den erfolgreichen Einsatz von TLR-Liganden genannt wurde (Heit et al., 2007; Schlosser et al., 2008).

Im Gegensatz dazu wurde der TLR-Ligand im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht partikulär, sondern in wäßriger Lösung mittels Injektion *i. p.* verabreicht, führte aber trotzdem zu einem erheblichen Steigerungseffekt auf die sekundäre Immunantwort nach LM-OVA. Für die weitere Verbesserung der T-Zell-Antwort mit dem getesteten Boosting-Protokoll konnte also auch die nichtpartikuläre Injektion eines TLR-Liganden als durchaus geeignet identifiziert werden. Dies ist um so bemerkenswerter, als von Pham et al. für den dieser Arbeit zugrundeliegenden Ansatz beschrieben ist, daß die zusätzliche Gabe von LPS nicht nur zu keiner weiteren Steigerung der T-Zell-Immunantwort führte, sondern diese sogar verminderte (Pham et al., 2010), womit die als Folge formulierte Empfehlung, zur Verkürzung des Verabreichungsintervalls ohne Adjuvantien zu applizieren, zumindest für den TLR-3-Liganden Poly(I:C) nicht zu gelten scheint.

Es kann also festgestellt werden, daß die zusätzliche Applikation des TLR-3-Liganden Poly(I:C) im untersuchten Vakzinierungsmodell gegenüber der Priming-Injektion ausschließlich mit PLGA-gebundenem Antigen die Induktion einer deutlich höheren, spezifischen wie gesamten, sekundären CD8⁺-T-Zell-Immunantwort durch Pathogen-Boosting ermöglicht. Zudem führt die zusätzliche Stimulation des Immunsystems durch das unspezifische Poly(I:C) auch bei dessen

nichtpartikulärer Verabreichung zu einem relativ höheren Anteil antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen an der Zahl aller CD8⁺-T-Zellen (Abb. 23) wie auch an der Zahl der aktivierten CD8⁺-T-Zellen. Sie wirkt damit im Sinne einer besonders zielgerichteten Nutzung der zellulären Immunantwort.

Somit hat sich das PLGA-basierte Priming gegenüber dem mit dendritischen Zellen nicht nur allgemein, sondern auch in der Hinsicht als überlegen erwiesen, daß durch Verabreichung eines TLR-3-Liganden eine weitere Verbesserung der Immunantwort möglich ist, die bei Priming mittels DC nicht besteht.

3 PLGA-basierte Vakzinierung mit Boosting kann auch bei autologem Antigen CD8⁺-T-Zell-immunogen sein

Das allgemeine T-Zell-immunogene Potential PLGA-basierter Antigenapplikation wurde in verschiedenen Arbeiten in vitro und in vivo gezeigt und kommt damit auch für den Einsatz gegen Tumoren in Frage (Zhang et al., 2011).

Der im Rahmen dieser Arbeit standardisierte und untersuchte innovative PLGA-Ansatz für ein Kurzzeit-Intervall-Boosting mit Pathogen führte in vivo zu vielversprechenden T-Zell-Immunantworten. Dabei kam das Modellantigen Ovalbumin in den in den Abschnitten III.1 bis III.7 dargestellten Versuchen als Fremdanigen, dem die Tiere zuvor noch nie ausgesetzt waren, zum Einsatz. Von einer relativ hohen Immunogenität des Antigens konnte also ausgegangen werden. Sie war für diese Stufen der Erprobung auch erwünscht. Die im Vergleich dazu geringe Immunogenität von Autoantigenen (Berzofsky et al., 2004) hat jedoch der Etablierung T-Zell-basierter Vakzinierungen gegen Tumoren bislang deutliche Grenzen gesetzt.

V. a. mit Blick auf mögliches Potential des untersuchten Ansatzes für den Einsatz gegen Tumoren wurde daher untersucht, ob mit ihm die Induktion spezifischer CD8⁺-T-Zell-Immunantworten auch gegen Autoantigen grundsätzlich möglich ist. Dazu wurde der unter III.8 dargestellte Versuch mit den transgenen Tieren der Gruppe 1 (AlbCre⁺/OVA⁺) konzipiert, die durch die Wirkung des Albumin-Promotors organspezifisch OVA auf ihren Hepatozyten exprimierten (Abb. 25). Somit war OVA für diese Tiere ein unmutiertes Autoantigen.

Bei zwei von den vier Tieren dieser Gruppe konnten SIINFEKL-spezifische T-Zell-Immunantworten detektiert werden, die erwartungsgemäß erheblich

geringer waren als in den Kontrollgruppen, für die OVA Fremdantigen war (Abb. 26). Durch intrazelluläre Färbung der Milzleukozyten auf verschiedene Funktionsmarker an Tag 70 konnte bestätigt werden, daß es sich bei den als SIINFEKL-spezifisch identifizierten Populationen tatsächlich um funktionelle CD8⁺-T-Zellen handelte (Abb. 29). Dies gilt insbesondere auch für die zwei Tiere aus der Autoantigen-Gruppe, bei denen nach der In-vitro-Stimulation mit SIINFEKL-Peptid sich der durchschnittliche Anteil der TNF- α -positiven an allen IFN- γ -positiven SIINFEKL-spezifischen T-Zellen mit 85,5 % sogar als höher herausstellte als in den Kontrollgruppen.

Damit konnte in vivo bewiesen werden, daß es grundsätzlich auch möglich ist, mit Hilfe des untersuchten Vakzinierungssystems spezifische Immunantworten gegen Autoantigene zu induzieren, was nahelegt, das definierte Modell (möglicherweise mit Modifikationen) auch für weitere Erprobung mit Blick auf gegen Tumoren gerichtete therapeutische Vakzinierung in Betracht zu ziehen.

Insofern es sich bei OVA für die Tiere der AlbCre⁺/OVA⁺-Gruppe um ein unmutiertes Autoantigen handelte, gegenüber dem der Körper besondere Mechanismen der Immuntoleranz aufweisen dürfte (Zhang et al., 2011), ist weitere Erprobung empfehlenswert, und es ist denkbar, daß spezifische polyklonale T-Zell-Immunantworten gegen mutierte Autoantigene in höherem Maße induziert werden können (Lennerz et al., 2005).

Daß die Immunantworten gegen unmutiertes Autoantigen deutlich geringer ausfielen als gegen Fremdantigene, mindert nicht den Wert der Feststellung, daß T-Zell-Immunantworten mit dem getesteten Vakzinierungssystem induzierbar waren und insbesondere auch der Kurzzeit-Boosting-Effekt genutzt werden konnte. Auch die Tatsache, daß nur bei der Hälfte der Tiere überhaupt eine gegen das Autoantigen gerichtete spezifische Immunantwort gemessen wurde, schmälert deren Bedeutung nicht. Sie deutet vielmehr auf tierindividuelle Gesichtspunkte hin, die für diese Induzierbarkeit zusätzlich zum Genotyp eine Rolle spielen.

4 Medizinische Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick

Die vorgestellten Ergebnisse belegen, zumindest auf mehreren Modellebenen, die grundsätzliche Anwendbarkeit PLGA-basierter Vakzinierungen mit heterologem Kurzzeit-Boosting in vivo und insbesondere deren Überlegenheit gegenüber

analoger DC-Vakzinierung, die derzeit die einzige T-Zell-Vakzinierung im klinischen Einsatz ist.

Die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene Möglichkeit, auch in einem heterologen Kurzzeit-Boosting-Modell mit Pathogen ein PLGA-Priming durch Gabe von Immunstimulanzien (hier eines TLR-Liganden) weiter zu verbessern, dürfte von grundsätzlichem Interesse für Vakzinierungsstrategien sein. Sie erweitert die Perspektive auch gegenüber der gegenteiligen Empfehlung, ein entsprechendes Kurzzeit-Boosting-Protokoll ohne Adjuvans anzuwenden (Pham et al., 2010).

Neben der deutlichen technologischen und medizinischen Vereinfachung durch PLGA gegenüber DC im Priming bedeutet insbesondere der sehr geringe zeitliche Abstand zwischen den Antigenapplikationen, der deutlich unter bisher üblicherweise genannten Größenordnungen für T-Zell-Vakzinierungen (vgl. Butler et al., 2011) liegt, erheblichen Vorteil für möglichen Einsatz in der medizinischen Praxis. Kurzfristig wirksame T-Zell-Vakzinierungen wären ein Meilenstein für Therapie und Prophylaxe.

Perspektiven zeigt der untersuchte Ansatz auch mit Blick auf den therapeutischen Einsatz gegen Autoantigene.

Die teilweise nicht nur hoffnungsvoll, sondern in manchen Versuchen spektakulär hohen Immunantworten sollten jedoch den Blick nicht darauf verstellen, daß dieses innovative Vakzinierungssystem sich noch in einer frühen Modellphase befindet und bis zu einer möglichen klinischen Etablierung noch erhebliche weitere Schritte notwendig sein werden.

Die Verwendung artifizieller Modellantigene wie Ovalbumin liefert zwar analytischen Nutzen, kann aber prognostisch nur begrenzt benutzt werden. Auch wird der Schritt von der Erprobung im Tiermodell in den Menschen einen kritischen Punkt darstellen. Daß eine Übertragung vielversprechender Ergebnisse aus Tiermodellen auf die Anwendung im Menschen nicht ohne weiteres gegeben ist, mußte schon für viele andere Vakzinierungsstrategien festgestellt werden (Hill et al., 2010; Nolz und Harty, 2011).

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben zudem PLGA-Mikrosphären hinsichtlich ihrer technologischen Eigenschaften sowie Beladungs- und Applikationsmöglichkeiten

als flexibles immunologisches Werkzeug bestätigt. Das unterstreicht den Wert der Idee, ihre Nutzung von einem pharmakologischen Hilfsstoff auch auf den immuntherapeutischen wie -prophylaktischen Bereich zu erweitern.

Vor dem Hintergrund, daß T-Zell-Vakzinierungen hinsichtlich solcher Erkrankungen besonderen Wert zu haben versprechen, denen bislang nur sehr unbefriedigend begegnet werden kann (Tumoren, Aids, Tuberkulose, Malaria), liegt die weitere Erforschung und Erprobung dieses neuartigen Vakzinierungsansatzes nahe. Nachdem der Fokus dieser Arbeit auf den Erst-Antigenkontakt gerichtet war, bietet sicherlich v. a. der Zweit-Antigenkontakt, das Boosting, noch viele Ansätze für weitere Optimierung, insbesondere mit dem Ziel, den Einsatz eines antigenspezifischen Pathogens zu überwinden, dessen Verfügbarkeit in praxi v. a. in der individuellen Therapie nicht gegeben wäre.

V ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen zur Erreichung verbesserter CD8⁺-T-Zell-Immunantworten durch Vakzinierung mit PLGA-Mikrosphären

Im Gegensatz zu „klassischen“, antikörperbasierten Vakzinierungen sind CD8⁺-T-Zell-Vakzinierungen trotz großer prophylaktischer und therapeutischer Herausforderungen noch kaum etabliert. Ein beschriebener innovativer Ansatz, der den Einsatz von PLGA-Mikrosphären mit einem Kurzzeit-Intervall-Boosting kombiniert, wurde aufgegriffen und unter verschiedenen Aspekten untersucht und zu einem Standard-Vakzinierungsprotokoll weiterentwickelt.

Als entscheidendes Kriterium für die optimale Nutzung des Boosting-Effekts wurde einerseits die heterologe Vakzinierung, andererseits die Reihenfolge mit PLGA-Priming und Pathogen-Boosting identifiziert, wobei das Priming grundsätzlich ohne Induktion einer systemischen Entzündung erfolgen kann.

Das Priming mit PLGA-Mikrosphären erwies sich im Vergleich zu dem mit dendritischen Zellen als besser geeignet für ein Kurzzeit-Boosting. Im Gegensatz zu analogem Vorgehen mit DC konnte die Wirkung des PLGA-Primings durch zusätzliche Gabe eines TLR-Liganden erheblich gesteigert werden.

Der erbrachte Nachweis, daß mit dem angewendeten Vakzinierungsmodell auch Immunantworten mit funktionellen CD8⁺-T-Zellen gegen ein unmutiertes Autoantigen induziert werden können, macht PLGA-Priming auch in Verbindung mit Kurzzeit-Intervall-Boosting zu einem interessanten Ansatz für die weitere Entwicklung von T-Zell-Vakzinierungen gegen Tumorerkrankungen.

Parameter wie Verabreichungsweg, Größe der PLGA-Mikrosphären und Peptidlänge des Antigens scheinen dem Ansatz keine übermäßig impraktikablen Einschränkungen vorzugeben, was Flexibilität und klinisches Potential erhöht.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche belegen insgesamt in vivo das Potential der Kombination von PLGA-Priming mit heterologem Kurzzeit-Intervall-Boosting für T-Zell-Vakzinierungen. Sie könnte sich daher angesichts der Nachteile und Limitationen von DC-Vakzinierungen, der einzigen bislang im Menschen eingesetzten T-Zell-Vakzinierung, zu einer Alternative mit erheblichen medizinisch-technischen und kostenmäßigen Vorteilen entwickeln.

VI SUMMARY

Improved CD8⁺ T-cell immune response using vaccination with PLGA-based microspheres

In contrast to “classical” antibody-based vaccines, CD8⁺ T-cell vaccines are yet little established in practical use though urgently needed for prophylactic and therapeutic purposes. A described novel vaccination approach combining use of PLGA microspheres for antigen application with short-interval pathogen booster immunization was further developed regarding various aspects to make it a vaccination protocol.

Heterologous boosting as well as application sequence using PLGA as carrier for priming and pathogen for booster immunization was identified to be the crucial point for optimal usage of short-interval boosting. Effective priming immunization was possible in absence of systemic inflammation.

Priming with PLGA microspheres was more suitable for induction of a strong secondary CD8⁺ T-cell response in the tested vaccination regime than priming with pulsed dendritic cells. In contrast to DC priming, effectiveness of priming with PLGA microspheres could be remarkably increased by additional application of the TLR3 ligand poly(I:C).

The proven feasibility of the tested vaccination protocol to induce immune responses including functional CD8⁺ T-cells even against unmutated autoantigens makes PLGA priming an interesting method for development of T-cell-based vaccination against tumors, in particular when it is combined with short-interval booster immunization using pathogens.

Technical parameters such as application method, size of PLGA microspheres and length of peptide antigen do not define very strict limitations regarding the feasibility of the system which means increase of flexibility and clinical potential.

In summary, experimental results of this thesis underline *in vivo* that combination of PLGA priming with heterologous short-interval booster immunization has interesting potential for T-cell vaccination development. Due to disadvantages and limitations of DC vaccination, PLGA antigen application using pathogen booster immunization could emerge as an alternative with considerable advantages regarding medical and technical aspects as well as clinical costs.

VII LITERATURVERZEICHNIS

Ahmed R, Butler LD, Bhatti L. T4+ T helper cell function in vivo: differential requirement for induction of antiviral cytotoxic T-cell and antibody responses. *J Virol* 1988; 62(6): 2102-6.

Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 1996; 272(5258): 54-60.

Akasaki Y, Kikuchi T, Irie M, Yamamoto Y, Arai T, Tanaka T, Joki T, Abe T. Cotransfection of Poly(I: C) and siRNA of IL-10 into fusions of dendritic and glioma cells enhances antitumor T helper type 1 induction in patients with glioma. *J Immunother* 2011; 34(2): 121-8.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124(4): 783-801.

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413(6857): 732-8.

Andreasen SO, Christensen JE, Marker O, Thomsen AR. Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8+ effector T cell responses. *J Immunol* 2000; 164(7): 3689-97.

Arens R, Schoenberger SP. Plasticity in programming of effector and memory CD8 T-cell formation. *Immunol Rev* 2010; 235(1): 190-205.

Badovinac VP, Porter BB, Harty JT. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol* 2002; 3(7): 619-26.

Badovinac VP, Messingham KA, Hamilton SE, Harty JT. Regulation of CD8+ T cells undergoing primary and secondary responses to infection in the same host. *J Immunol* 2003; 170(10): 4933-42.

Badovinac VP, Messingham KA, Jabbari A, Haring JS, Harty JT. Accelerated CD8+ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nat Med* 2005; 11(7): 748-56.

Bala I, Hariharan S, Kumar MN. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2004; 21(5): 387-422.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.

Benvenuti F, Lagaudrière-Gesbert C, Grandjean I, Jancic C, Hivroz C, Trautmann A, Lantz O, Amigorena S. Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. *J Immunol* 2004; 172(1): 292-301.

Berke G. The CTL's kiss of death. *Cell* 1995; 81(1): 9-12.

Berzofsky JA, Terabe M, Oh S, Belyakov IM, Ahlers JD, Janik JE, Morris JC. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J Clin Invest* 2004; 113(11): 1515-25.

Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 2004; 430(6996): 257-63.

Bevan MJ. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* 1976; 143: 1283-8.

Bevan MJ. Antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* 1995; 182(3): 639-41.

Bolhassani A, Zahedifard F. Therapeutic live vaccines as a potential anticancer strategy. *Int J Cancer* 2012; 131(8): 1733-43.

Bruhn KW, Craft N, Miller JF. *Listeria* as a vaccine vector. *Microbes Infect* 2007; 9(10): 1226-35.

Butler NS, Nolz JC, Harty JT. Immunologic considerations for generating memory CD8 T cells through vaccination. *Cell Microbiol* 2011; 13(7): 925-33.

Casadevall A. Passive antibody therapies: progress and continuing challenges. *Clin Immunol* 1999; 93(1): 5-15.

Caskey M, Lefebvre F, Filali-Mouhim A, Cameron MJ, Goulet JP, Haddad EK, Breton G, Trumpfheller C, Pollak S, Shimeliovich I, Duque-Alarcon A, Pan L, Nelkenbaum A, Salazar AM, Schlesinger SJ, Steinman RM, Sékaly RP. Synthetic double-stranded RNA induces innate immune responses similar to a live viral vaccine in humans. *J Exp Med* 2011; 208(12): 2357-66.

Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, Banchereau J. B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 1994; 180(5): 1841-7.

Cho BK, Wang C, Sugawa S, Eisen HN, Chen J. Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(6): 2976-81.

Condotta SA, Richer MJ, Badovinac VP, Harty JT. Probing CD8 T cell responses with *Listeria monocytogenes* infection. *Adv Immunol* 2012; 113: 51-80.

Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, Jenkins MK, Mescher MF. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 1999; 162(6): 3256-62.

Cush SS, Flaño E. KLRG1+NKG2A+ CD8 T cells mediate protection and participate in memory responses during γ -herpesvirus infection. *J Immunol* 2011; 186(7): 4051-8.

Damoiseaux JG, Yagita H, Okumura K, van Breda Vriesman PJ. Costimulatory molecules CD80 and CD86 in the rat; tissue distribution and expression by antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* 1998; 64(6): 803-9.

De Vries IJ, Krooshoop DJ, Scharenborg NM, Lesterhuis WJ, Diepstra JH, Van Muijen GN, Strijk SP, Ruers TJ, Boerman OC, Oyen WJ, Adema GJ, Punt CJ, Figdor CG. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res* 2003; 63(1): 12-7.

Doyle C, Strominger JL. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* 1987; 330 (6145): 256-9.

Dutton RW, Bradley LM, Swain SL. T cell memory. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 201-23.

Esser MT, Marchese RD, Kierstead LS, Tussey LG, Wang F, Chirmule N, Washabaugh MW. Memory T cells and vaccines. *Vaccine* 2003; 21(5-6): 419-30.

Fischer S, Schlosser E, Mueller M, Csaba N, Merkle HP, Groettrup M, Gander B. Concomitant delivery of a CTL-restricted peptide antigen and CpG ODN by PLGA microparticles induces cellular immune response. *J Drug Target* 2009; 17(8): 652-61.

Flinsenberg TW, Compeer EB, Boelens JJ, Boes M. Antigen cross-presentation: extending recent laboratory findings to therapeutic intervention. *Clin Exp Immunol* 2011; 165(1): 8-18.

Fortier ME, Kent S, Ashdown H, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287(4): R759-66.

Gerelchuluun T, Lee YH, Lee YR, Im SA, Song S, Park JS, Han K, Kim K, Lee CK. Dendritic cells process antigens encapsulated in a biodegradable polymer, poly(D,L-lactide-co-glycolide), via an alternate class I MHC processing pathway. *Arch Pharm Res* 2007; 30(11): 1440-6.

Goossens PL, Milon G. Induction of protective CD8⁺ T lymphocytes by an attenuated *Listeria monocytogenes* actA mutant. *Int Immunol* 1992; 4(12): 1413-8.

Goossens PL, Montixi C, Saron MF, Rodriguez M, Zavala F, Milon G. *Listeria monocytogenes*: a live vector able to deliver heterologous protein within the cytosol and to drive a CD8 dependent T cell response. *Biologicals* 1995; 23(2): 135-43.

Hamdy S, Haddadi A, Hung RW, Lavasanifar A. Targeting dendritic cells with nano-particulate PLGA cancer vaccine formulations. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63(10-11): 943-55.

Hammerstrom AE, Cauley DH, Atkinson BJ, Sharma P. Cancer immunotherapy: sipuleucel-T and beyond. *Pharmacotherapy* 2011; 31(8): 813-28.

He H, Genovese KJ, Swaggerty CL, MacKinnon KM, Kogut MH. Co-stimulation with TLR3 and TLR21 ligands synergistically up-regulates Th1-cytokine IFN- γ and regulatory cytokine IL-10 expression in chicken monocytes. *Dev Comp Immunol* 2012; 36(4): 756-60.

Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, Davey GM, Wilson NS, Carbone FR, Villadangos JA. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 2004; 199: 9-26.

Heit A, Schmitz F, Haas T, Busch DH, Wagner H. Antigen co-encapsulated with adjuvants efficiently drive protective T cell immunity. *Eur J Immunol* 2007; 37(8): 2063-74.

Heit A, Busch DH, Wagner H, Schmitz F. Vaccine protocols for enhanced immunogenicity of exogenous antigens. *Int J Med Microbiol* 2008; 298(1-2): 27-32.

Hikono H, Kohlmeier JE, Takamura S, Wittmer ST, Roberts AD, Woodland DL. Activation phenotype, rather than central- or effector-memory phenotype, predicts the recall efficacy of memory CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 2007; 204(7): 1625-36.

Hill AV, Reyes-Sandoval A, O'Hara G, Ewer K, Lawrie A, Goodman A, Nicosia A, Folgori A, Colloca S, Cortese R, Gilbert SC, Draper SJ. Prime-boost vectored malaria vaccines: progress and prospects. *Hum Vaccin* 2010; 6(1): 78-83.

Hintzen RQ, de Jong R, Lens SM, Brouwer M, Baars P, van Lier RA. Regulation of CD27 expression on subsets of mature T-lymphocytes. *J Immunol* 1993; 151(5): 2426-35.

Hovav AH, Panas MW, Osuna CE, Cayabyab MJ, Autissier P, Letvin NL. The impact of a boosting immunogen on the differentiation of secondary memory CD8⁺ T cells. *J Virol* 2007; 81(23): 12793-802.

Huster KM, Busch V, Schiemann M, Linkemann K, Kerksiek KM, Wagner H, Busch DH. Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8⁺ memory T cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(15): 5610-5.

Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Witmer-Pack M, Steinman RM. Dendritic cells as antigen presenting cells in vivo. *Int Rev Immunol* 1990; 6(2-3): 197-206.

Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 2000; 21(23): 2475-90.

Jiang W, Gupta RK, Deshpande MC, Schwendeman SP. Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57(3): 391-410.

Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De los Santos K, Sparwasser T, Wu S, Vuthoori S, Ko K, Zavala F, Pamer EG, Littman DR, Lang RA. In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 2002; 17(2): 211-20.

Kägi D, Vignaux F, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994; 265(5171): 528-30.

Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T, Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006; 441(7089): 101-5.

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11(5): 373-84.

Keegan ME, Whittum-Hudson JA, Mark Saltzman W. Biomimetic design in microparticulate vaccines. *Biomaterials* 2003; 24(24): 4435-43.

Kim EH, Sullivan JA, Plisch EH, Tejera MM, Jatzek A, Choi KY, Suresh M. Signal integration by Akt regulates CD8 T cell effector and memory differentiation. *J Immunol* 2012; 188(9): 4305-14.

Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 1995; 267(5195): 243-6.

Kovalcsik E, Lowe K, Fischer M, Dalgleish A, Bodman-Smith MD. Poly(I:C)-induced tumour cell death leads to DC maturation and Th1 activation. *Cancer Immunol Immunother* 2011; 60(11): 1609-24.

Lanzavecchia A. Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr Opin Immunol* 1996; 8(3): 348-54.

Lanzavecchia A, Sallusto F. From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. *Curr Opin Immunol* 2000; 12(1): 92-8.

Le Monnier A, Autret N, Join-Lambert OF, Jaubert F, Charbit A, Berche P, Kayal S. ActA is required for crossing of the fetoplacental barrier by *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 2007; 75(2): 950-7.

Lennerz V, Fatho M, Gentilini C, Frye RA, Lifke A, Ferel D, Wölfel C, Huber C, Wölfel T. The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(44): 16013-8.

Li M, Rouaud O, Poncelet D. Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. *Int J Pharm* 2008; 363(1-2): 26-39.

Lieberman J, Frankel FR. Engineered *Listeria monocytogenes* as an AIDS vaccine. *Vaccine* 2002; 20(15): 2007-10.

Ma W, Chen M, Kaushal S, McElroy M, Zhang Y, Ozkan C, Bouvet M, Kruse C, Grotjahn D, Ichim T, Minev B. PLGA nanoparticle-mediated delivery of tumor antigenic peptides elicits effective immune responses. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 1475-87.

Mahapatro A, Singh DK. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J Nanobiotechnology* 2011; 9:55.

Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)* 2011; 3(3): 1377-1397.

Matsumoto M, Kikkawa S, Kohase M, Miyake K, Seya T. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293(5): 1364-9.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388(6640): 394-7.

Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release* 2008; 125(3): 193-209.

Nolz JC, Harty JT. Protective capacity of memory CD8⁺ T cells is dictated by antigen exposure history and nature of the infection. *Immunity* 2011; 34(5): 781-93.

Okada H. One- and three-month release injectable microspheres of the LH-RH superagonist leuporelin acetate. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997; 28(1): 43-70.

Parker DC. The functions of antigen recognition in T cell-dependent B cell activation. *Semin Immunol* 1993; 5(6): 413-20.

Paterson Y, Maciag PC. *Listeria*-based vaccines for cancer treatment. *Mol Ther* 2005; 7(5): 454-60.

Peters C, Domann E, Darbouche A, Chakraborty T, Mielke ME. Tailoring host immune responses to *Listeria* by manipulation of virulence genes - the interface between innate and acquired immunity. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 35(3): 243-53.

Pfeuffer T, Goebel W, Laubinger J, Bachmann M, Kuhn M. LaXp180, a mammalian ActA-binding protein, identified with the yeast two-hybrid system, co-localizes with intracellular *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* 2000; 2(2): 101-14.

Pham NL, Pewe LL, Fleenor CJ, Langlois RA, Legge KL, Badovinac VP, Harty JT. Exploiting cross-priming to generate protective CD8 T-cell immunity rapidly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(27): 12198-203.

Pope C, Kim SK, Marzo A, Masopust D, Williams K, Jiang J, Shen H, Lefrançois L. Organ-specific regulation of the CD8 T cell response to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 2001; 166(5): 3402-9.

Pulendran B, Ahmed R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* 2006; 124(4): 849-63.

Purbhoo MA, Irvine DJ, Huppa JB, Davis MM. T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat Immunol* 2004; 5(5): 524-30.

Purcell AW, McCluskey J, Rossjohn J. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6(5): 404-14.

Rai D, Pham NL, Harty JT, Badovinac VP. Tracking the total CD8 T cell response to infection reveals substantial discordance in magnitude and kinetics between inbred and outbred hosts. *J Immunol* 2009; 183(12): 7672-81.

Reis e Sousa C. Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity* 2001; 14(5): 495-8.

Ren WN, Chang CK, Fan HH, Guo F, Ren YN, Yang J, Guo J, Li X. A combination of exosomes carrying TSA derived from HLA-A2-positive human white buffy coat and polyI:C for use as a subcellular antitumor vaccination. *J Immunoassay Immunochem* 2011; 32(3): 207-18.

Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004; 10(9): 909-15.

Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401(6754): 659-60.

Salvador A, Igartua M, Hernández RM, Pedraz JL. Combination of immune stimulating adjuvants with poly(lactide-co-glycolide) microspheres enhances the immune response of vaccines. *Vaccine* 2012; 30(3): 589-96.

Sandhu U, Cebula M, Behme S, Riemer P, Wodarczyk C, Metzger D, Reimann J, Schirmbeck R, Hauser H, Wirth D. Strict control of transgene expression in a mouse model for sensitive biological applications based on RMCE compatible ES cells. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(1):e1.

Sarkar S, Kalia V, Haining WN, Konieczny BT, Subramaniam S, Ahmed R. Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *J Exp Med* 2008; 205(3): 625-40.

Schlosser, E. Antigenbeladung von Dendritischen Zellen mit PLGA-Mikrosphären zur Immuntherapie bei Tumoren. Diss rer nat, Konstanz, 2007.

Schlosser E, Mueller M, Fischer S, Basta S, Busch DH, Gander B, Groettrup M. TLR ligands and antigen need to be coencapsulated into the same biodegradable microsphere for the generation of potent cytotoxic T lymphocyte responses. *Vaccine* 2008; 26(13): 1626-37.

Schmidt CS, Mescher MF. Peptide antigen priming of naive, but not memory, CD8 T cells requires a third signal that can be provided by IL-12. *J Immunol* 2002; 168(11): 5521-9.

Schoen C. Entwicklung neuartiger bakterieller Vektoren zur Übertragung von zellassozierten Antigenen, DNA und RNA auf der Basis virulenzattenuierter *L. monocytogenes*. Diss rer nat, Würzburg, 2005.

Schreiber TH, Raez L, Rosenblatt JD, Podack ER. Tumor immunogenicity and responsiveness to cancer vaccine therapy: the state of the art. *Semin Immunol* 2010; 22(3): 105-12.

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004; 75(2): 163-89.

Schwarz K, Meijerink E, Speiser DE, Tissot AC, Cielens I, Renhof R, Dishlers A, Pumpens P, Bachmann MF. Efficient homologous prime-boost strategies for T cell vaccination based on virus-like particles. *Eur J Immunol* 2005; 35(3): 816-21.

Shen H, Ackerman AL, Cody V, Giodini A, Hinson ER, Cresswell P, Edelson RL, Saltzman WM, Hanlon DJ. Enhanced and prolonged cross-presentation following endosomal escape of exogenous antigens encapsulated in biodegradable nanoparticles. *Immunology* 2006; 117(1): 78-88.

Shen Z, Reznikoff G, Dranoff G, Rock KL. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* 1997; 158(6): 2723-30.

Slomkowski S, Alemán J, Gilbert R, Hess M, Horie K, Jones R, Kubisa P, Meisel I, Mormann W, Penczek S, Stepto R. Terminology of polymers and polymerization processes in dispersed systems (IUPAC Recommendations 2011). *Pure Appl Chem* 2011; 83(12): 2229–2259.

Starks H, Bruhn KW, Shen H, Barry RA, Dubensky TW, Brockstedt D, Hinrichs DJ, Higgins DE, Miller JF, Giedlin M, Bouwer HG. *Listeria monocytogenes* as a vaccine vector: virulence attenuation or existing antivector immunity does not diminish therapeutic efficacy. *J Immunol* 2004; 173(1): 420-7.

Statistisches Bundesamt Wiesbaden. Gesundheit. In: Todesursachen in Deutschland. Statistisches Bundesamt Wiesbaden, 2010.

Steinhagen F, Kinjo T, Bode C, Klinman DM. TLR-based immune adjuvants. *Vaccine* 2011; 29(17): 3341-55.

Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 271-96.

Thiel M, Wolfs MJ, Bauer S, Wenning AS, Burckhart T, Schwarz EC, Scott AM, Renner C, Hoth M. Efficiency of T-cell costimulation by CD80 and CD86 cross-linking correlates with calcium entry. *Immunology* 2010; 129(1): 28-40.

Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 975-1028.

Trumpfheller C, Longhi MP, Caskey M, Idoyaga J, Bozzacco L, Keler T, Schlesinger SJ, Steinman RM. Dendritic cell-targeted protein vaccines: a novel approach to induce T-cell immunity. *J Intern Med* 2012; 271(2): 183-92.

Veiga-Fernandes H, Walter U, Bourgeois C, McLean A, Rocha B. Response of naïve and memory CD8⁺ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nat Immunol* 2000; 1(1): 47-53.

Waeckerle-Men Y, Scandella E, Uetz-Von Allmen E, Ludewig B, Gillessen S, Merkle HP, Gander B, Groettrup M. Phenotype and functional analysis of human monocyte-derived dendritic cells loaded with biodegradable poly(lactide-co-glycolide) microspheres for immunotherapy. *J Immunol Methods* 2004; 287(1-2): 109-24.

Waeckerle-Men Y, Allmen EU, Gander B, Scandella E, Schlosser E, Schmidtke G, Merkle HP, Groettrup M. Encapsulation of proteins and peptides into biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres prolongs and enhances antigen presentation by human dendritic cells. *Vaccine* 2006; 24(11): 1847-57.

Wallecha A, Maciag PC, Rivera S, Paterson Y, Shahabi V. Construction and characterization of an attenuated *Listeria monocytogenes* strain for clinical use in cancer immunotherapy. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16(1): 96-103.

Wang HY, Wang RF. Enhancing cancer immunotherapy by intracellular delivery of cell-penetrating peptides and stimulation of pattern-recognition receptor signaling. *Adv Immunol* 2012; 114: 151-76.

Westermann J, Ehlers EM, Exton MS, Kaiser M, Bode U. Migration of naïve, effector and memory T cells: implications for the regulation of immune responses. *Immunol Rev.* 2001; 184: 20-37.

Whitmore MM, DeVeer MJ, Edling A, Oates RK, Simons B, Lindner D, Williams BR. Synergistic activation of innate immunity by double-stranded RNA and CpG DNA promotes enhanced antitumor activity. *Cancer Res* 2004; 64(16): 5850-60.

Wirth TC, Harty JT, Badovinac VP. Modulating numbers and phenotype of CD8⁺ T cells in secondary immune responses. *Eur J Immunol* 2010(a); 40(7): 1916-26.

Wirth TC, Xue HH, Rai D, Sabel JT, Bair T, Harty JT, Badovinac VP. Repetitive antigen stimulation induces stepwise transcriptome diversification but preserves a core signature of memory CD8(+) T cell differentiation. *Immunity* 2010(b); 33(1): 128-40.

Wirth TC, Martin MD, Starbeck-Miller G, Harty JT, Badovinac VP. Secondary CD8+ T-cell responses are controlled by systemic inflammation. *Eur J Immunol* 2011; 41(5): 1321-33.

Wischke C, Schwendeman SP. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int J Pharm* 2008; 364(2): 298-327.

Woodland DL. Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. *Trends Immunol* 2004; 25(2): 98-104.

Yang S, Liu F, Wang QJ, Rosenberg SA, Morgan RA. The shedding of CD62L (L-selectin) regulates the acquisition of lytic activity in human tumor reactive T lymphocytes. *PLoS One* 2011; 6(7): e22560.

Zhang N, Bevan MJ. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* 2011; 35(2): 161-8.

Zhang XQ, Dahle CE, Weiner GJ, Salem AK. A comparative study of the antigen-specific immune response induced by co-delivery of CpG ODN and antigen using fusion molecules or biodegradable microparticles. *J Pharm Sci* 2007; 96(12): 3283-92.

Zhang Z, Tongchusak S, Mizukami Y, Kang YJ, Ioji T, Touma M, Reinhold B, Keskin DB, Reinherz EL, Sasada T. Induction of anti-tumor cytotoxic T cell responses through PLGA-nanoparticle mediated antigen delivery. *Biomaterials* 2011; 32(14): 3666-78.

Zinkernagel RM. Immunology taught by viruses. *Science* 1996; 271(5246): 173-8.

VIII DANKSAGUNG

Zunächst gilt mein Dank für die Überlassung des Themas und die Annahme als Doktoranden Herrn Prof. Dr. med. vet. Thomas Göbel, dem Betreuer dieser Dissertation, ebenso meinem Mentor und Leiter meiner Arbeitsgruppe an der Medizinischen Hochschule Hannover, Herrn Dr. med. Thomas Wirth. Für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten in der von ihm geleiteten Klinik durchzuführen, danke ich Herrn Prof. Dr. med. Michael Manns.

Der Dank, den ich Herrn Dr. Wirth sage, bezieht sich nicht nur auf seine in jeder Hinsicht vorbildliche Unterstützung als wohlwollender und geduldiger, aber auch kritischer Begleiter bei der Entstehung dieser Dissertation und als Leiter meiner Arbeitsgruppe. Wesentlich durch seine Kompetenz und Begeisterung konnte ich mir Zusammenhänge des Fachs sowie wissenschaftliches Arbeiten und Denken immer weiter erschließen. Das war nicht nur fachlich ungemein wertvoll, sondern auch persönlich motivierend und weiterbringend.

Mein Dank an Herrn Professor Göbel begründet sich nicht nur auf seine Bereitschaft zur Betreuung meiner Dissertation mit in Hannover durchgeführten Experimenten. Erst seine auch über erhebliche Entfernung unkomplizierte und kurzfristige Erreichbarkeit, die stets freundliche, schnelle und kompetente Beantwortung meiner Fragen sowie seine wertvollen Hinweise und Anmerkungen ermöglichten, daß aus meinen experimentellen Arbeiten diese tiermedizinische Dissertation entstehen konnte.

Weiter gilt mein Dank den Mitarbeitern und Kollegen aus der AG Wirth für ihre freundliche und kollegiale Aufnahme sowie bereitwillige Hilfe nicht nur bei der anfänglichen Einarbeitung, sondern auch jederzeit im Laboralltag.

Einen besonderen Dank richte ich an die gesamte Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. rer. nat. Florian Kühnel, deren nicht nur fachliche, über die Grenzen der Arbeitsgruppe hinausgehende Unterstützung bemerkenswert und für mich über die gesamte Zeit von großer Bedeutung war. Insbesondere kompetente Einführung und viele geduldige Erklärungen am FACS-Gerät durch Herrn Dr. rer. nat. Norman Woller trugen erheblich zu dieser Arbeit bei.